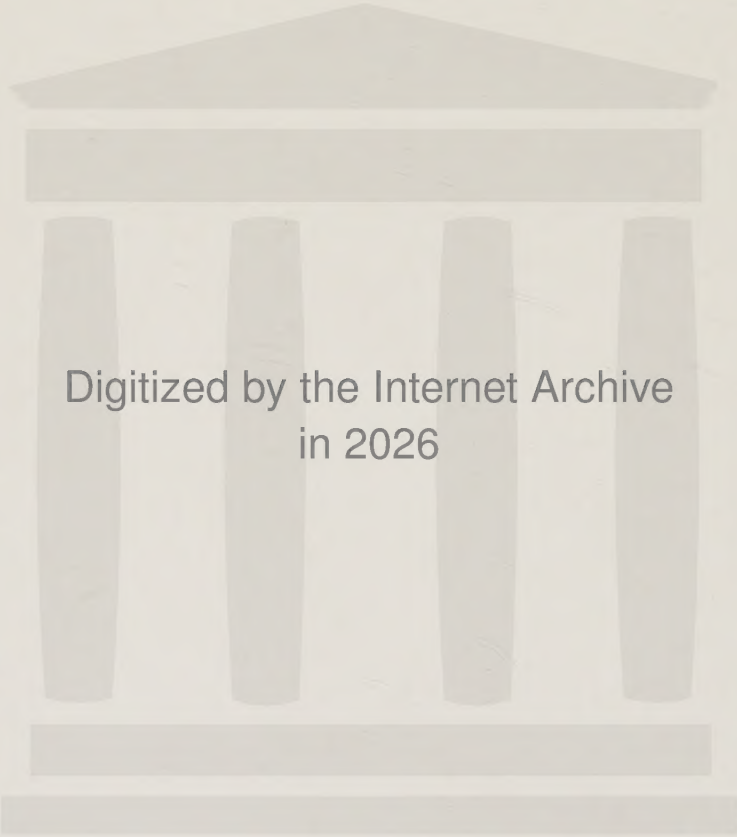


**CHARAKTERISIERUNG VON STAPHYLOCOCCUS AUREUS -
STÄMMEN AUS ROHMILCH UNTER BESONDERER
BERÜCKSICHTIGUNG DES KLUMPUNGSFAKTORS**

KATHARINA GANG-STILLER

Disbui. München

1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546219_0029

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Lehrstuhl: Prof. Dr. G. Terplan

Charakterisierung von Staphylococcus aureus-
Stämmen aus Rohmilch unter besonderer
Berücksichtigung des Klumpungsfaktors

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Katharina Gang-Stiller
aus
Gennachhausen

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. G. Terplan

Korreferent: Prof. Dr. J. Meyer

Tag der Promotion: 29. Juli 1988

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	1
2 Schrifttum	2
2.1 Taxonomie der Micrococcaceae und ihre Bedeutung als Erreger von Mastitiden und Lebensmittelintoxikationen	2
2.2 Penicillinase (β -Lactamase)	12
2.3 Enterotoxinbildungsvermögen	14
2.4 Staphylokoagulase	17
2.5 Klumpungsfaktor	20
2.6 Theronuklease	24
2.7 Hämolyseverhalten	26
2.8 Pigmentbildung	29
2.9 Eigelbfaktor	32
3 Eigene Untersuchungen	34
3.1 Material und Methodik	34
3.1.1 Untersuchungsmaterial	34
3.1.2 Nährböden und Reagenzien	35
3.1.3 Auswahl verdächtiger Kolonien	38
3.1.4 Differenzierung verdächtiger Kolonien	39
3.1.4.1 Mikroskopische Untersuchung	39
3.1.4.2 Prüfung des Gramverhaltens	39
3.1.4.3 Nachweis der Katalase	39
3.1.5 Weitere Differenzierung grampositiver, katalasepositiver Kokken	40
3.1.5.1 Nachweis der Theronuklease	40
3.1.5.2 Nachweis der Koagulase	41
3.1.5.3 Nachweis des Klumpungsfaktors	41
3.1.5.3.1 Konventioneller Nachweis mit Kaninchen- und Rinderplasma	42
3.1.5.3.2 Nachweis mittels indirektem Hämagglu- tinationstest	42
3.1.5.4 Prüfung auf Kapselbildung	43

3.1.5.5	Nachweis der Acetoinbildung	43
3.1.5.6	Nachweis der Maltosespaltung unter aero- ben und der Mannitspaltung unter aeroben und anaeroben Bedingungen	44
3.1.5.7	Beurteilung des Hämolyseverhaltens	44
3.1.5.8	Nachweis der Penicillinase	45
3.1.5.9	Prüfung des Enterotoxinbildungsvermögens	45
3.1.5.10	Nachweis des Eigelbfaktors	46
3.1.5.11	Beurteilung der Pigmentbildung	46
3.2	Ergebnisse	47
3.2.1	Identifizierung von Staphylococcus aureus	47
3.2.2	Vorkommen der Thermonuklease	47
3.2.3	Vorkommen der Koagulase	48
3.2.4	Vorkommen des Klumpungsfaktors	49
3.2.5	Kapselbildung	49
3.2.6	Zusammenfassung der Ergebnisse zum Vor- kommen von Thermonuklease, Koagulase und Klumpungsfaktor	50
3.2.7	Ergebnisse der Prüfung auf Acetoinbildung und Maltose- bzw. Mannitabbau	51
3.2.8	Ergebnisse der sich atypisch verhaltenden Isolate	52
3.2.9	Ermittlung einiger sonstiger Eigenschaften (außer Thermonuklease, Koagulase, Klum- pungsfaktor)	53
3.2.9.1	Hämolyseverhalten	53
3.2.9.2	Penicillinase	54
3.2.9.3	Enterotoxinbildung	54
3.2.9.4	Eigelbfaktor	55
3.2.9.5	Pigmentbildung	56
4	Besprechung der Ergebnisse und Diskussion	57
5	Zusammenfassung/Summary	72
6	Literaturverzeichnis	76

1 Einleitung

Staphylococcus (*S.*)*aureus* ist ein weit verbreiteter potentiell pathogener Keim. Besondere Bedeutung kommt ihm im veterinärmedizinischen Bereich als Erreger meist subklinisch verlaufender Mastitiden des Rindes, auf dem Lebensmittelsektor als häufige Ursache von Lebensmittelintoxikationen zu. *S.aureus* besitzt verschiedene, als mutmaßliche Pathogenitätsfaktoren angesehene Eigenschaften, deren Nachweis in Kulturen (u.a. Koagulase, Klumpungsfaktor, Thermonuklease, Eigelbfaktor, Hämolyse, Pigmentierung) oder Lebensmitteln (Thermonuklease, Enterotoxine) diagnostische Bedeutung haben kann. In der Routineuntersuchung von Lebensmitteln speziell von Milchproben auf *S.aureus* wird bei der Bestätigung verdächtiger Isolate dem Nachweis der Koagulase oder des Klumpungsfaktors besonderes Gewicht beigemessen. Seit längerem ist bekannt, daß beide Pathogenitätsfaktoren nicht identisch sind, doch wurde aufgrund von Untersuchungen an Stämmen hauptsächlich aus humanklinischem Material davon ausgegangen, daß beide Substanzen zu einem hohem Prozentsatz gemeinsam vorkommen. In der Routinediagnostik wird daher oft der raschere Nachweis des Klumpungsfaktors bei der Identifizierung bevorzugt.

Die Ergebnisse neuerer Veröffentlichungen (BOUWMAN und VINCENTIE, 1984; JASPER et al., 1984; RÖDER, 1985; NOWAKOWSKI et al., 1985; BECKER et al., 1987) deuten darauf hin, daß bei bovinen *S.aureus*-Stämmen andere Verhältnisse vorliegen und ein relativ hoher Anteil aus Rohmilch und Viertelgemelksproben isolierter koagulasepositiver Staphylokokken keinen Klumpungsfaktor besitzt. In den eigenen Untersuchungen sollte daher an einer größeren Zahl von Isolaten aus möglichst vielen Milchtierbeständen geprüft werden, ob und inwieweit sich die Beobachtungen im südwestlichen Bayern bestätigen lassen.

2 Schrifttum

2.1 Taxonomie der Micrococcaceae und ihre Bedeutung als Erreger von Mastitiden und Lebensmittelintoxikationen

Der Familie der Micrococcaceae werden grampositive, katalasepositive Kokken zugeordnet. Man unterteilt sie heute in die vier Gattungen Micrococcus, Stomatococcus, Planococcus und Staphylococcus (SCHLEIFER, 1986). Für den Milchsektor und den veterinärmedizinischen Bereich sind vor allem die Genera Micrococcus und Staphylococcus von Interesse.

Micrococcus spp. gehören zu den häufigen saprophytären Kontaminanten der Rohmilch (KURZWEIL und BUSSE, 1973) und kommen als thermoresistente und somit die Pasteurisierung zumindest zu einem gewissen Prozentsatz überlebende Keime (HILEMAN, 1940) auch in erhitzter Milch vor. Ihre Bedeutung als Erreger von Mastitiden ist nur schwer einzuschätzen. In der Routinediagnostik, aber auch in älteren Arbeiten, werden in der Regel die koagulasenegative, gram- und katalasepositive Kokken als "Mikrokokken" bezeichnet, ohne eine Differenzierung zwischen koagulasenegativen Staphylokokken und Micrococcus spp. vorzunehmen (SCHALM et al., 1971; DEVRIESE, 1979).

Fälle von Lebensmittelintoxikationen durch Micrococcus spp. konnten im Schrifttum nicht gefunden werden.

Das Genus Staphylococcus hat in den letzten Jahren wesentliche taxonomische Veränderungen erfahren. Werden in der 8. Auflage von BERGEY's Manual of Determinative Bacteriology (BAIRD-PARKER, 1974) noch drei Spezies (*S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.saprophyticus*) genannt, so schlägt man heute eine Einteilung in 26 Arten vor. Eine Zusammenstellung unter Berücksichtigung des hauptsächlichen Standortes findet sich in Tab. 1. Mit Ausnahme von *S.arlettae*, *S.equorum*, *S.kloosii*, *S.aureus* subsp.

anaerobius, *S.lugdunensis* und *S.schleiferi* wurden alle in Tab. 1 genannten Arten in die Liste der Spezies des Genus *Staphylococcus* der 1. Auflage von *BERGEY's Manual of Systematic Bacteriology* (1986) übernommen. *S.aureus* subsp. *anaerobius* und *S.saccharolyticus* weichen von den Merkmalen der übrigen Staphylokokken unter anderem durch fehlende Katalasebildung und schwaches oder fehlendes Wachstum bei aerober Bebrütung ab (KILPPER-BÄLZ und SCHLEIFER, 1981; DE LA FUENTE et al., 1985).

Tabelle 1: Moderne Systematik des Genus *Staphylococcus*

Koagulasepositive Spezies

Spezies	Hauptsächliches Vorkommen	Autor(en)
<i>S.aureus</i>	Mensch und Tier	ROSENBACH, 1884
<i>S.aureus</i> subsp. ¹ <i>anaerobius</i>	Schaf	DE LA FUENTE et al., 1985
<i>S.intermedius</i> ²	Hund, Pferd, Nerz Tauben	HAJEK, 1976
<i>S.hyicus</i> subsp. ³ <i>hyicus</i>	Schwein, Geflügel	DEVRIESE et al., 1978

1: *M. abscedens* ovis, *M. pyogenes* ovis

2: *S.aureus* var. *canis*, *S.aureus* Biotyp E und F

3: *S. epidermidis* Biotyp 2

Fortsetzung Tabelle 1:

Koagulasenegative Spezies

Spezies	Hauptsächliches Vorkommen	Autor(en)
S.epidermidis	Haut des Menschen	SCHLEIFER und KLOOS, 1975
S.saphrophyticus		
S.cohnii		
S.hämolyticus		
S.xylosus	Haut des Menschen	KLOOS und SCHLEIFER, 1975
S.warneri		
S.capitis		
S.hominis		
S.simulans		
S.sciuri	Nagetiere	KLOOS et al., 1976
S.hyicus subsp. chromogenes	Rind	DEVRIESE et al., 1978
S.saccharolyticus	Mensch	KILPPER-BÄLZ und SCHLEIFER, 1981
S.caseolyticus	Milch und Milchprodukte	SCHLEIFER et al., 1982
S.carnosus	Hartwürste	SCHLEIFER und FISCHER, 1982
S.auricularis	Mensch (äußeres Ohr)	KLOOS und SCHLEIFER, 1983
S.gallinarum	Geflügel	] DEVRIESE et al., 1983
S.caprae	Ziege	
S.lentus	Schaf, Ziege	SCHLEIFER et al., 1983
S.arlettae	Geflügel, Ziege	] SCHLEIFER et al., 1984
S.equorum	Pferd	
S.kloosii	wildlebende Säugetiere	
S.lugdunensis	Mensch	] FRENEY et al., 1988
S.schleiferi	Mensch	

Die Bedeutung koagulasenegativer Staphylokokken für die Entstehung von Euterentzündungen ist noch nicht eindeutig geklärt (SMITH und HAGSTAD, 1985). Wie einer Reihe von Untersuchungen, die sich mit dem Vorkommen dieser Keime auf der Zitzenhaut und in Viertelgemelks- und Rohmilchproben befassen (DEVRIESE, 1979; DEVRIESE und DE KEYSER, 1980; LANGLOIS et al., 1984; DEVRIESE et al., 1985; HARVEY und GILMOUR, 1985), zu entnehmen ist, können einige Spezies häufiger im Bereich der Zitzen nachgewiesen werden. Hierzu gehören *S.xylosus*, *S.epidermidis*, *S.sciuri*, *S.hämolyticus*, *S.hyicus* subsp. *chromogenes*, *S.simulans*, *S.cohnii*. Andere Arten, vor allem solche, die normalerweise ihren Standort auf der Haut des Menschen haben (SCHLEIFER und KLOOS, 1975; KLOOS und SCHLEIFER, 1975), traten nur sporadisch auf. Ein Hinweis auf ätiologische Zusammenhänge mit Mastitiden könnte sich auch aus der Beobachtung ergeben, daß die Anwesenheit einiger der oben genannten Spezies in Viertelgemelksproben mit einer Erhöhung des Gehaltes an somatischen Zellen verbunden war (DEVRIESE und DE KEYSER, 1980; TIMMS und SCHULTZ, 1987).

Wenig erforscht ist die Rolle der koagulasenegativen Staphylokokken bei der Entstehung von Lebensmittelintoxikationen. Derartige Fälle werden im Schrifttum zwar vereinzelt beschrieben, sind aber in epidemiologischer Hinsicht nicht eindeutig bewiesen (BERGDOLL, 1972).

Die Gruppe der koagulasepositiven Staphylokokken wurde ebenfalls um einige neue Spezies erweitert. Wie aus Tab. 1 hervorgeht, sind neben *S.aureus* dessen Subspezies *anaerobius* sowie die Arten *S.intermedius* und *S.hyicus* subsp. *hyicus* als Koagulasebildner beschrieben worden.

S.aureus gilt als einer der häufigsten Mastitiserreger des Rindes (LEE und FROST, 1970; WILSON und RICHARDS, 1980; ANDREWS et al., 1983), kann aber auch bei anderen Haustieren und beim Menschen in verschiedensten Organen Entzündungen hervorrufen (BLOBEL und BRÜCKLER, 1980). Da viele *S.aureus*-Stämme die Fähigkeit zur Bildung von

Enterotoxinen in Lebensmittel besitzen, ergibt sich beim Menschen eine zusätzliche Gefährdung durch Lebensmittel-intoxikationen (BERGDOLL, 1983).

S.aureus-Stämme des Menschen und verschiedener Tierarten werden aufgrund ihrer standortabhängig unterschiedlichen biologischen und biochemischen Merkmale in Biotypen eingeteilt (HAJEK und MARSALEK, 1971). Biotyp A kommt hauptsächlich beim Menschen vor, Biotyp B bei Schwein und Geflügel, Biotyp C bei Rind und Schaf und Biotyp D beim Kaninchen. Die ehemaligen Biotypen E und F von Hund, Pferd, Nerz, Taube und Fuchs werden heute unter der Spezies *S.intermedius* (HAJEK, 1976) zusammengefaßt. Die Biotypen können anhand einiger weniger Reaktionen, die auch die Lysotypie einschließen, differenziert werden (HAJEK und MARSALEK, 1976).

Auf einige Besonderheiten von *S.aureus* subsp. *anaerobius* wurde bereits eingegangen. Der Keim gilt als Erreger von Abzessen bei Schafen (DE LA FUENTE et al., 1985). Über ätiologische Zusammenhänge mit Euterentzündungen liegen keine Daten vor. Die verschiedenen bei *S.aureus* beschriebenen Enterotoxine (A-E) konnten von DE LA FUENTE et al. (1985) nicht nachgewiesen werden.

S.intermedius unterscheidet sich von *S.aureus* hinsichtlich der Zellwandstruktur und einiger biochemischer Parameter (HAJEK, 1976). Während DEVRIESE (1979), LANGLOIS et al., (1984), BIBERSTEIN et al. (1984), DEVRIESE et al. (1985), HARVEY und GILMOUR (1985) und SCHAUPETER (1987) unter von Rindern isolierten koagulasepositiven Staphylokokken keine *S.intermedius*-Stämme fanden, konnten GARCIA et al. (1980) eine von 57 Kulturen aus Milchproben von an klinischen oder subklinischen Mastitiden leidenden Kühen und WATTS et al. (1986a) vier von 130 Isolaten aus Rindermilchdrüsen als *S.intermedius* identifizieren. Auf eine eventuelle Beteiligung von *S.intermedius* an Mastitiden von Kühen, die der Fleischproduktion dienen, weist die Arbeit von WATTS et al. (1986b) hin.

Obwohl keine umfassenden Daten darüber vorliegen, inwieweit *S. intermedius* als Kontaminant von Milch und Milchprodukten anzusehen ist, muß er aufgrund des von KATO et al. (1978), FUKUDA et al. (1984) und ALMAZAN et al. (1987) nachgewiesenen Enterotoxinbildungsvermögens zumindest als potentieller Erreger von Lebensmittelintoxikationen angesehen werden.

S. hyicus wird in zwei Subspezies, eine kogulasenegative (*S. hyicus chromogenes*) und eine zu 24-56 % kogulasepositive (*S. hyicus hyicus*) unterteilt (SCHLEIFER, 1986). Eine Trennung in zwei getrennte Spezies wurde inzwischen von HAJEK et al. (1986) vorgeschlagen. *S. hyicus hyicus* ist bereits seit längerem als Erreger von Hautkrankheiten des Schweines bekannt (SOMPOLINSKY, 1953), konnte aber auch von verschiedenen Untersuchern auf Zitzen, in Viertelgemelksproben und Milch nachgewiesen werden (DEVRIESE, 1979; DEVRIESE und DE KEYSER, 1980; GARCIA et al., 1980; PHILLIPS und KLOOS, 1981; LANGLOIS et al., 1984; HARVEY und GILMOUR, 1985; JASPER et al., 1985; TAKEUCHI et al., 1985; WATTS et al., 1986a, b), ohne daß sich eindeutige Beziehungen zu euterentzündlichen Geschehen herstellen ließen.

Obwohl HOOVER et al. (1983) in Affenfütterungstests die Bildung eines toxischen Prinzips durch *S. hyicus hyicus* nachweisen konnten, sind Lebensmittelvergiftungen bisher nicht bekannt geworden.

Die Differenzierung innerhalb der Gruppe der koagulasepositiven Spezies *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus* subsp. *hyicus* ist mit den klassischen Differenzierungskriterien (Koagulase-, Klumpungsfaktor-, Thernonukleasebildungsvermögen) allein nicht möglich. Auf serologische Verfahren, die sich in diesem Zusammenhang bezüglich der Parameter Koagulase und Thernonuklease anbieten, wird in den Abschnitten 2.4 und 2.6 eingegangen. Eine Zusammenstellung einiger wesentlicher Eigenschaften der koagulasepositiven Spezies findet sich in Tab. 2.

Tabelle 2: Zusammenstellung einiger wesentlicher Eigenschaften von *S.aureus*, *S.intermedius* und *S.hyicus hyicus* (nach DEVRIESE und HAJEK, 1980 und SCHLEIFER, 1986)

	<i>S.aureus</i>	<i>S.intermedius</i>	<i>S.hyicus hyicus</i>
Koagulase	+	+	d
Klumpungsfaktor	+	d	-
Thermonuklease	+	+	+
Pigmentbildung	+	-	-
Hämolyse	+	d	-
Acetoin	+	-	-
Maltose	+	(w)	-
Mannit (aerob)	+	d	-
(anaerob)	+	-*	-*

+: 90 % oder mehr der Stämme positiv; -: 90 % oder mehr der Stämme negativ; d: 11-89 % der Stämme positiv; (): verzögerte Reaktion; w: schwache Reaktion; *: keine positiven Befunde unter den geprüften Stämmen

Die Stabilität der in Tab. 2 zusammengefaßten Differenzierungskriterien wird von verschiedenen Parametern beeinflußt. Wesentliche Bedeutung kommt dabei der Herkunft der Isolate zu. Eine umfassende Darstellung dieser Problematik findet sich bei SCHAUPETER (1987). Da auch bei Staphylokokkenstämmen des Rindes Abweichungen von den in Tab. 2 dargestellten allgemeinen Merkmalskombinationen zu erwarten sind, werden in Tab. 3 bis 5 die im Schrifttum beschriebenen Verhältnisse bei von Rindern isolierten *S.aureus*- (Tab. 3), *S.intermedius*- (Tab. 4) und *S.hyicus hyicus*-Stämmen (Tab. 5) zusammengestellt.

Tabelle 3: Zusammenstellung einiger wesentlicher Eigenschaften von S.aureus-Stämmen des Rindes

Autoren	I	II	III	IV	V	VI	VII
Anzahl getesteter Stämme	92	46	451	104	203	53	11 ²
Koagulase ¹	100	100	96,7	n.g.	99	100	100
Klumpungs- faktor ¹	96,7	n.g.	98,4	n.g.	n.g.	n.g.	100
TNase ¹	n.g.	100	94	97,1	98	92,5	100
Hämolyse ¹	n.g.	100	97,3	86,5	99	100	45,4
Pigment- bildung ¹	82,6	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
Acetoin ¹	n.g.	n.g.	n.g.	62,5	n.g.	96,2	100
Maltose ¹	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	100
Mannit aerob ¹	100	n.g.	n.g.	100	n.g.	n.g.	90,9 ³
Mannit anaerob ¹	n.g.	93,5	98,9	n.g.	n.g.	100	90,9 ³

1: Angaben in % positiver Stämme; 2: darunter je 1 Hundestamm und ein Katzenstamm; 3: Katzenstamm negativ

n.g.: nicht geprüft

I: HAJEK und MARSALEK, 1969a

II: GARCIA et al., 1980

III: BRÜCKLER et al., 1981a

IV: JONSSON und HOLMBERG, 1981

V: JASPER et al., 1985

VI: ABBAR et al., 1986

VII: SCHAUPETER, 1987

Tabelle 4: Zusammenstellung einiger wesentlicher Eigenschaften von *S.intermedius*-Stämmen des Rindes

Autoren	GARCIA et al., 1980	WATTS, 1986a
Anzahl getesteter Stämme	1	4
Koagulase	+	n.g.
Klumpungsfaktor	n.g.	n.g.
TNase	+	n.g.
Hämolyse	-	+
Pigmentbildung	n.g.	-
Acetoin	n.g.	n.g.
Maltose	n.g.	n.g.
Mannit aerob	n.g.	¹ +
Mannit anaerob	-	¹ +

n.g.: nicht geprüft

1: nicht angegeben, ob aerob oder anaerob

Tabelle 5: Zusammenstellung einiger wesentlicher Eigenschaften von *S.hyicus hyicus*-Stämmen des Rindes

Autoren	AMTSBERG, ¹ 1979	DEVRIESE, 1979	LANGLOIS et al., 1984	TAKEUCHI et al., 1985
Anzahl getesteter Stämme ²	55	9	24	6
Koagulase ²	5,5	11,1	21	0
Klumpungs- faktor ²	0	n.g.	n.g.	0
TNase ²	100	100	n.g.	100
Hämolyse ²	14,5	0	n.g.	0
Pigment- bildung ²	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
Acetoin ²	0	0	n.g.	n.g.
Maltose ²	0	0	12,5	n.g.
Mannit aerob ²	0	0	n.g.	n.g.
Mannit anaerob ²	0	n.g.	n.g.	n.g.

1: *S.epidermidis* Biotyp 2;

2: Angaben in % positiver Stämme

n.g.: nicht geprüft

2.2 Penicillinase (β -Lactamase)

Penicillin ist wegen seiner hervorragenden Wirksamkeit gegenüber den Mastitisstreptokokken (*S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*) in der Therapie der Euterentzündungen schon seit langem eines der am meisten verwendeten Antibiotika (OBIGER, 1964). Auch bei der Behandlung von Staphylokokkenmastitiden könnte Penicillin G als Mittel der Wahl angesehen werden, doch ergibt sich eine Einengung der Indikation aus der Resistenzentwicklung der Staphylokokken (GEDEK und KLEINSCHROTH, 1979; GEDEK, 1981). Als Hauptursache dieser Resistenzentwicklung ist die Fähigkeit mancher Staphylokokken zur Bildung von Penicillinase anzusehen (ABRAHAM und CHAIN, 1940). Daneben wird noch das von SABBATH et al. (1977) als "Penicillintoleranz" bezeichnete Phänomen der Resistenz gegenüber der bakteriziden Wirkung von Penicillinen bei manchen *S. aureus*-Stämmen beschrieben.

Mehrere Typen im allgemeinen plasmidkodierter Penicillinasen sind bekannt. Die Plasmide können von penicillinresistenten auf penicillinsensible Staphylokokken übertragen werden (LACEY, 1975). Bei potentiellen Penicillinasebildnern wird durch Penicillin G die Penicillinasebildung induziert, wie FRESE et al. (1972) an einer Vielzahl von *S. aureus*-Stämmen des Rindes nachweisen konnten. Interessant, wegen ihrer Konsequenzen für die Therapie, erscheint auch die Tatsache, daß Penicillinase extrazellulär vorliegt und somit in die Umgebung eines Entzündungsherdes abgegeben wird (IMSANDE, 1978; SABOLIC et al., 1980).

Der Wirkungsmechanismus der Penicillinase beruht auf der hydrolytischen Spaltung des β -Lactamringes, wodurch das Antibiotikum inaktiviert wird (OSOWIECKI et al., 1981). Bei den penicillinasefesten Penicillinen (Methicillin, Oxacillin, Cloxacillin, Dicloxacillin) gelang es durch Einführung längerer Seitenketten den β -Lactamring vor der

Tabelle 6: Vorkommen von aus Mastitissekret oder Milchproben isolierten penicillinasebildenden S.aureus-Stämmen (nach Literaturangaben)

Anzahl getesteter Stämme	Anzahl penicillinase- positiver Stämme (%)	Autor(en)
1251	357 (28,5) ¹	FRESE et al., 1972
136	40 (29,4) ¹	GEDEK, 1978
192	21 (10,9) ¹	GEDEK, 1978
100	45 (45) ²	GEDEK und KLEINSCHROTH, 1979
119	33 (27,7) ²	GEDEK und KLEINSCHROTH, 1979
1178	535 (45,4)	SABOLIC et al., 1980
1395	870 (62,4) ³	FROST und O'BOYLE, 1981
2063	(ca. 30)	LUPKE, 1982
287	30 (10,4)	FRANKLIN und RANTZIEN, 1983
221	145 (66,1)	JONES und HEATH, 1985
871	140 (16,0)	RÖDER, 1985
106	74 (69,8)	CRAVEN et al., 1986
249	83 (33,3)	SCHAEREN et al., 1986

1: ein Stamm/Herde isoliert

2: mehrere Stämme/Herde isoliert

3: Ergebnisse mehrerer Jahre zusammengefaßt

enzymatischen Spaltung zu schützen (ADAM und CHRIST, 1987). Auf diese Weise wurde zum Beispiel beim Methicillin eine 30fach geringere penicillinasebedingte Hydrolyserate erreicht (OTTEN et al., 1975). Allerdings können Staphylokokken auch gegen die oben genannten Penicilline Resistenzen entwickeln, die jedoch nicht auf einer enzymatischen Inaktivierung beruhen. Diese, auch als Methicillinresistenz (GEDEK, 1981) bezeichnete Unempfindlichkeit, scheint gegenüber der Resistenz durch Penicillinasebildungsvermögen bei bovinen *S.aureus*-Stämmen keine wesentliche Rolle zu spielen. So fand GEDEK (1981) unter 347 penicillinasebildenden *S.aureus*-Stämmen aus bayerischen Milchviehherden nur ein methicillin-resistentes Isolat.

Hinsichtlich des Vorkommens penicillinasepositiver *S.aureus*-Stämme bei Rindern liegen eine Reihe von Erhebungen vor, deren Ergebnisse in Tab. 6 zusammengefaßt werden.

2.3 Enterotoxinbildungsvermögen

Die durch Staphylokokken-Enterotoxine (SE) verursachten Lebensmittelintoxikationen stellen weltweit eine der häufigsten bakteriell bedingten, durch Lebensmittel hervorgerufenen Erkrankungen dar. SE sind extrazelluläre, sehr hitzestabile Toxine, die von einigen Staphylokokkenspezies (siehe 2.1) gebildet werden. Sie rufen beim Menschen nach einer relativ kurzen Inkubationszeit (1-6 h) einen vor allem durch Erbrechen gekennzeichneten Symptomenkomplex hervor (BERGDOLL, 1979). Bei den SE handelt es sich um Proteine mit einem Molekulargewicht von 26 000 - 30 000 (BERGDOLL, 1983), die in der Lage sind, im Wirbeltierorganismus Antikörperbildung hervorzurufen (SURGALLA et al., 1954). Bisher sind aufgrund ihrer immunologischen Eigenschaften sieben unter-

schiedliche SE-Typen differenziert worden, die in alphabetischer Reihenfolge mit den Buchstaben A - E bezeichnet werden (BERGDOLL, 1983). SEC tritt in den Untertypen C₁, C₂ und C₃ auf (BERGDOLL et al., 1965; REISER et al., 1984). Es ist aber davon auszugehen, daß noch nicht serologisch identifizierte SE-Typen existieren, denn im Affenfütterungstest wurden einige positive S.aureus- (BERGDOLL und ROBBINS, 1973) bzw. S.hyicus hyicus-Stämme (HOOVER et al., 1983) gefunden, die nicht mit den bekannten spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden konnten. BERGDOLL (1983) geht davon aus, daß ca. 5 % der staphylokokkenbedingten Ausbrüche durch noch nicht identifizierte SE verursacht werden.

Entscheidend für die Identifizierung der SE ist unter anderem die Empfindlichkeit der angewendeten Nachweisverfahren. So konnten KOKAN und BERGDOLL (1987) bei 23,6 % von S.aureus-Stämmen, die im Affenfütterungstest positiv und im Enterotoxinnachweis mit dem Agargel-diffusionsverfahren negativ reagiert hatten, mit dem ELISA-Verfahren ein oder mehrere der bekannten Enterotoxine nachweisen. Bedeutung gewinnt diese Beobachtung auch dadurch, daß nach den oben genannten Autoren Enterotoxinmengen im Bereich der Nachweisgrenze der Agargel-diffusionsverfahren ausreichen, um eine Lebensmittel-intoxikation zu verursachen.

Aus Übersichten bei MAYER (1975) und HARTUNG (1986) geht hervor, daß eine Beziehung zwischen Enterotoxinbildungs-vermögen und Herkunft der Staphylokokken besteht. Demnach war der Anteil an SE-Bildnern unter Stämmen humanen Ursprungs (bis zu 95 %) deutlich höher als bei jenen, die aus Kuhmilch bzw. Mastitissekret isoliert worden waren. Über das Vorkommen von Enterotoxinbildnern bei Staphylokokkenstämmen aus Rindermilchproben liegen verschiedene Berichte vor (siehe Tab. 7), denen zu entnehmen ist, daß die meisten Autoren bei derartigen Stämmen lediglich einen Anteil von 2 - 15 % Toxinbildner fanden.

stittissekret oder Milchproben isolierten S.aureus-Stämmen

der Zahl		Häufigkeit der SE-Typen (Zahl der Stämme) II					Autor(en)
I		A	B	C	D	E	
D	E						
15	-	2	0	2	2	-	CASMAN et al., 1967
1	-	1	1	0	0	-	TERPLAN und ZAADHOF, 1969
0	-	0	0	0	0	-	UNTERMANN und SINELL, 1970
11	-	0	0	1	1	-	OLSON et al., 1970
5	-	2	2	0	0	-	TERPLAN et al., 1971
-	-	0	0	0	-	-	UNTERMANN et al., 1973
3	0	0	0	0	0	0	WIENEKE, 1974
15	0	3	1	0	4	0	MAYER, 1975
14	0	10	0	4	10	0	NISKANEN und KOIRANEN, 1977
1	0	0	0	0	0	0	GARCIA et al., 1980
3	0	0	0	0	0	0	LOMBAI et al., 1980
55	0	67	5	42	43	0	KATO und KUME, 1980
4	-	4	8	4	3	-	BRÜCKLER et al., 1981a
2	0	0	0	0	0	0	HILL, 1983a
2	-	0	0	0	0	-	ABBAR et al., 1986
131	0	89	17	53	63	0	insgesamt

Hinsichtlich des Vorkommens der verschiedenen SE-Typen gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben. Während bei enterotoxinbildenden *S.aureus*-Stämmen humanen Ursprungs sehr oft SEA gefunden wird, scheint bei Rinderstämmen auch SEC häufig zu sein (BERGDOLL, 1985; siehe auch Tab. 7).

Da koagulasepositive Staphylokokken häufig in Milch anzutreffen sind (TERPLAN und ZAADHOF, 1969) und einige von diesen in der Lage sind Enterotoxine zu bilden, stellt sich die Frage, inwieweit durch diese Keime ein Risiko für den Konsumenten von Milch und Milchprodukten gegeben ist. Über Staphylokokkenintoxikationen durch Milcherzeugnisse, wie Käse, Trockenmilchpulver oder Butter wird häufiger berichtet als über Vergiftungen durch Konsummilch. Das relativ seltene Auftreten der letztgenannten Intoxikationen ist durch mehrere Faktoren bedingt, zu denen die Antagonismen der Begleitflora, das Absterben der Erreger bei der Milcherhitzung, das relativ seltene Enterotoxinbildungsvermögen boviner *S.aureus*-Stämme und Verdünnungseffekte gezählt werden können (TERPLAN und ZAADHOF, 1969; UNTERMANN et al., 1973).

2.4 Staphylokoagulase

Der Koagulasetest gilt sowohl bei der Diagnostik der Mastitisserreger als auch bei der bakteriologischen Untersuchung von Lebensmitteln als die wesentlichste Bestätigungsreaktion für *S.aureus*. Er wird heute in der Regel im Röhrchen mit einem hohen Plasmaanteil durchgeführt (siehe Abschnitt Material und Methodik der vorliegenden Arbeit). Es besteht aber auch die Möglichkeit, durch Zusatz von Plasma oder Fibrinogen zum festen Selektivnährboden den Koagulasenachweis mit der Isolierung und Zählung der Keime direkt zu koppeln (DEVOYOD et al., 1976; STADHOUDERS et al., 1976;

HAUSCHILD et al., 1979).

Die ersten Berichte über die staphylokokkenbedingte Gerinnung von Plasma (Gänseplasma) stammen von LOEB (1903). Wesentliche und heute noch gültige Erkenntnisse sind den wenig später durchgeführten Untersuchungen von MUCH (1908) zu entnehmen. Dieser bestätigte nicht nur die Beobachtungen LOEB's unter Anwendung von Menschen-, Pferd- und Hammelplasma, sondern er wies auch darauf hin, daß nicht alle Staphylokokkenspezies Koagulasen bilden und die Gerinnung aufgrund fibrinolytischer Eigenschaften des Erregers wieder gelöst werden kann.

Heute ist die Existenz mehrerer serologisch unterscheidbarer Staphylokoagulasen bekannt, durch deren Typisierung epidemiologische Erhebungen über Staphylokokkeninfektionen und staphylokokkenbedingte Lebensmittelintoxikationen erleichtert werden (RAMMELKAMP et al., 1950; USHIODA et al., 1981). Außerdem konnten IGARASHI et al. (1985) feststellen, daß Koagulasen von *S. intermedius* und solche von *S. aureus* serologisch voneinander abgrenzbar sind und sich somit ähnlich wie bei den verschiedenen Staphylokokkenthernukleasen (siehe unter 2.6) Möglichkeiten zur Speziesdifferenzierung anbieten. Unabhängig von serologischen Unterschieden scheinen die Staphylokoagulasen den gleichen Wirkungsmechanismus zu besitzen. Nach ZAJDEL et al. (1973, 1975) handelt es sich bei der Koagulase um ein extrazelluläres Protein, das in der Lage ist, mit einem Plasmafaktor (SMITH und HALE, 1944), der von TAGER (1948) als "Coagulase Reacting Factor (CRF)" bezeichnet wurde, einen Komplex ("Staphylothrombin") zu bilden. Dieser Komplex reagiert mit dem Substrat Fibrinogen und führt dabei letzteres in unlösliches Fibrin über. Ob es sich bei CRF um Prothrombin selbst oder nur um ein ihm ähnliches Prinzip handelt, ist noch nicht eindeutig geklärt. Eine kritische Diskussion findet sich bei ZAJDEL et al. (1975). Für die Durchführung des Koagulasetests in der Praxis erscheint in diesem Zusammenhang wesentlich,

daß Plasma verschiedener Tierspezies sich hinsichtlich der Koagulaseempfindlichkeit unterschiedlich verhält, ein Phänomen, das von ZAJDEL et al. (1973) sowohl auf die unterschiedliche Affinität zwischen dem jeweiligen CRF und der Koagulase, als auch auf eine unterschiedliche Aktivität des CRF/Koagulase-Komplexes zurückgeführt wird. Möglicherweise enthält das Plasma mancher Tierarten nur relativ geringe Mengen an CRF, wie von DUTHIE und LORENZ (1952) und ORTH et al. (1971) zum Beispiel für Rinderplasma berichtet wird. Bei der Untersuchung von Lebensmitteln auf *S.aureus* wird im allgemeinen Kaninchenplasma empfohlen (ICMSF, 1978; ISO, 1983; DIN, 1988). Die Verwendung von Schweineplasma soll, wenn Isolate verschiedener tierartlicher Herkunft zu erfassen sind, von Vorteil sein (BLOBEL und BRÜCKLER, 1980). *S.aureus*-Stämme aus Rohmilch koagulierten in Untersuchungen von GRÜN (1968) Rinderplasma bereits nach 3 h, während Stämme humanen Ursprungs hierzu überhaupt nicht in der Lage waren. Im Gegensatz hierzu konnten HIRVELÄ und KORKEALA (1982) keinen Vorteil bei der Verwendung von Rinderplasma gegenüber dem Plasma anderer Tierarten (darunter Kaninchen und Schwein) feststellen: Unabhängig davon, ob es sich um Stämme aus Mastitismilch oder um Isolate aus Lebensmittelintoxikationen handelte, war Plasma von Rindern dem der anderen Tierarten unterlegen.

Neben der Herkunft des Plasmas sind falschnegative Ergebnisse im Koagulasetest auch auf andere mit dem Plasma in Beziehung stehende Ursachen zurückzuführen. In diesem Zusammenhang kommen vor allem Plasmin und Proteasen in Betracht. Im Plasma enthaltenes Plasminogen kann durch eine enzymähnliche Substanz, Staphylokinase, in fibrinolytisch aktives Plasmin übergeführt werden (ORTH et al., 1971). Das Staphylokinasebildungsvermögen scheint je nach Herkunft der *S.aureus*-Stämme zu variieren. So waren nach KITZROW und BLOBEL (1981) nur 3 % der geprüften humanen, aber 17 % der bovinen Stämme positiv. Da Schweineplasma

nur geringe Mengen an Plasminogen aufweist, empfehlen ORTH et al. (1971) dessen Verwendung. Nach KITZROW und BLOBEL (1981) kann durch Zusatz eines Proteinaseinhibitors (Trasylol) zum Plasma sowohl die Plasminogenumwandlung verhindert, als auch die fibrinolytische Aktivität des Plasmin gehemmt werden.

Proteasen können nach KITZROW und BLOBEL (1981) die Koagulaseaktivität selbst sowie auch die Reaktivität vor allem des Fibrinogens beeinträchtigen. Für die Praxis des qualitativen Koagulasenachweises hatten diese Enzyme allerdings keinen Einfluß, da im Plasma Proteaseinhibitoren und Serumalbumin, letzteres führt zur Substratkonkurrenz, vorhanden sind.

Nicht nur das Plasma beeinflusst das Ergebnis des Koagulasetests, sondern auch der verwendete Gerinnungshemmer. Mit Citrat stabilisiertes Plasma weist zwei Nachteile auf. Zum einen besteht die Möglichkeit falschpositiver Ergebnisse durch citratabbauende Streptokokken und Mikrokokken (LITKENHOUS et al., 1968) oder Enterobacteriaceae (MUSHIN und KERR, 1954). Zum anderen können falschpositive Ergebnisse durch Pseudokoagulaseaktivität auftreten (WEGRZYNOWICZ et al., 1979; 1980), die durch den Zusatz von EDTA gehemmt wird. Aus beiden Gründen erscheint EDTA als Stabilisator daher besser geeignet, wenn auch HIRVELÄ und KORKEALA (1982) in Experimenten mit Reinkulturen eine Überlegenheit von citratstabilisiertem Kaninchenplasma feststellen konnten.

2.5 Klumpungsfaktor

Bereits MUCH (1908) hatte bei seinen Untersuchungen zur Plasmagerinnung durch *S.aureus* festgestellt, daß beim Verreiben von Kulturmateri al an der Glaswand der Plasma enthaltenden Röhrchen und beim Mischen von Kulturmateri al mit Plasma eine Verklumpung eintritt. Diese Beobachtung

wurde erst 1934 von BIRCH-HIRSCHFELD und 1943 von CADNESS-GRAVES et al. wieder aufgegriffen und für ein einfaches diagnostisches Verfahren zur Staphylokokken-differenzierung nutzbar gemacht. Bei diesem Test wird entweder Kulturmateriel direkt in einem Tropfen Plasma verrieben (BIRCH-HIRSCHFELD, 1934) oder zunächst in einem Tropfen Wasser das Koloniemateriel aufgeschwemmt und anschließend mit Plasma vermischt (CADNESS-GRAVES et al., 1943). Die Bildung deutlich sichtbarer Klumpen wird als positives Ergebnis gewertet.

Zunächst nahm man an, daß Koagulase (siehe 2.4) und das Verklumpung bewirkende Prinzip identisch seien. So sollte nach BERGER (1943) die Verklumpung durch zellwandgebundene, die Gerinnung im Röhrchen durch freie Koagulase hervorgerufen werden. An der Richtigkeit dieser These traten allerdings durch Untersuchungen von LINSELL und GORRILL (1951) Zweifel auf, die wenig später durch DUTHIE (1954) bestätigt werden konnten. Während unter Einwirkung von Koagulase lösliches Fibrinogen in unlösliches Fibrin übergeführt wird (siehe 2.4), reagiert der auf der Zellwand lokalisierte Klumpungsfaktor (DUTHIE, 1955) mit Fibrinogen (Fibrinogenrezeptor) (DUTHIE, 1954, 1955). Inzwischen ist es gelungen den Klumpungsfaktor zu isolieren, zu reinigen und seinen Wirkungsmechanismus weiter aufzuklären. Detaillierte Angaben hierzu finden sich bei JELJASZEWICZ et al. (1983).

Zwischen dem Plasma verschiedener Tierarten bestehen hinsichtlich seiner Brauchbarkeit für den Klumpungstest Unterschiede. So waren nach Untersuchungen von DUTHIE (1955) Plasma von Hund, Maus, Mensch und Kaninchen gut, Plasma von Rind und Pferd bedingt und Plasma von Schwein und Schaf nicht geeignet. Verantwortlich hierfür sollen Differenzen in der Struktur des Fibrinogens der einzelnen Tierarten sein (JELJASZEWICZ et al., 1983).

Seit einigen Jahren sind im Handel verschiedene Testsysteme zum Nachweis des Klumpungsfaktors erhältlich, die

auf den Prinzipien der Hämagglutination (DUTHIE, 1955; FLANDROIS und CARRET, 1981) oder der Latexagglutination (ESSERS und RADEBOLD, 1980) beruhen. Aus Untersuchungen zur Brauchbarkeit derartiger Verfahren geht hervor, daß die meisten dieser Methoden annähernd mit den im konventionellen Objektträgertest ermittelten Ergebnissen übereinstimmen (BECKER et al., 1987).

Da der Nachweis des Klumpungsfaktors auf dem Objektträger eine wesentlich einfachere durchführbare Methode zur Identifizierung von *S.aureus* darstellt als der Koagulasetest, und Arbeiten aus dem humanklinischen Bereich zu entnehmen ist, daß bei diesem Material eine relativ hohe Übereinstimmung zwischen dem gleichzeitigen Vorkommen von Koagulase und Klumpungsfaktor gegeben ist, wurde häufig nur der Klumpungstest zur Bestätigung verdächtiger Isolate herangezogen. So konnte nach den Arbeiten von CADNESS-GRAVES et al. (1943), JENKINS und METZGER (1959), GRÜN (1961), HIGHSMITH und SHOTTS (1965), NOBLE (1966), GROSSGEBAUER et al. (1968), LAVALLEE und TOURIGNY (1968), GRUMMIT (1969), BRANDISH und WILLIS (1970), RAYMOND und TRAUB (1970), CARRET et al. (1982), ALDRIGDE et al. (1984), BAKER et al. (1985) und BROWN (1986) bei 100 bis etwa 95 % aller koagulasepositiven Staphylokokken der Klumpungsfaktor nachgewiesen werden. In den Untersuchungen von WILLIAMS und HARPER (1946), KLEMPERER und HAUGHTON (1957), JELJASZEWICZ (1958), MORTON und COHN (1972) und MYRICK und ELLNER (1982) waren allerdings nur 95 bis etwa 70 % der geprüften klinischen Isolate positiv (BECKER et al., 1987). Hinsichtlich des Vorkommens des Klumpungsfaktors bei *S.aureus* von Tieren divergieren die Angaben im Schrifttum. Nach Untersuchungen von HAJEK und MARSALEK (1976) reagierten Isolate von Hund, Pferd, Nerz, Taube und Fuchs nur zu maximal 40 % deutlich im Klumpungstest. Allerdings wurden die den Biotypen E und F zugeordneten Stämme später von HAJEK (1976) zu einer neuen Spezies *S.intermedius* zusammengefaßt. Unter 67

Tabelle 8: Vorkommen des Klumpungsfaktors bei *S. aureus*-Stämmen des Rindes (in Anlehnung an BECKER et. al., 1987)

Anzahl isoliert getest. aus Stämme	Anzahl positiver Stämme (%)	Herkunfts- land bzw. -region	Autor(en)
92	Mastitiden	89 (96,7)	CSSR (Olmütz) HAJEK und MAR- SALEK, 1969a
80	Nasen	76 (95)	CSSR (Olmütz) HAJEK und MAR- SALEK, 1969a
360	Staphylo- kokkenin- fektionen	360 (100)	BRD (n.a.) BRÜCKLER et al., 1974
30	n.a.	30 (100)	CSSR (Olmütz) HAJEK und MAR- SALEK, 1976
200	Milch	187 (93,5)	Frankreich POUTREL und DUCELLIEZ, 1979
100	n.a.	97-100 (97-100) ¹	BRD (Gießen) BRÜCKLER, et al., 1981a
n.a.	Rohmilch	n.a. (79) ¹	Niederlande BOUWMAN und VINCENTIE, 1984
238	Rohmilch	117 (49,2) ²	Nord-america JASPER et al., 1984
871	Rohmilch	723 (83)	BRD (Ober- und Nieder- bayern) RÖDER, 1985
n.a.	Mastitiden	n.a. (82-84)	Polen NOWAKOWSKI et al., 1985
267	Rohmilch	225 (84,3)	BRD (Ober- und Nieder- bayern) BECKER et al., 1987

1:ermittelt mit einem Hämagglutinationstest (Staphyslide)

2:ermittelt mit einem Latextest, n.a.: nicht angegeben

Stämmen von Tauben war kein positives Isolat (HAJEK und MARSALEK, 1969b). Lange Zeit galten die S.aureus-Stämme des Rindes als zu einem hohen Prozentsatz klumpungsfaktorpositiv. In den letzten Jahren wurden allerdings aus Milch eine Reihe von Isolaten gewonnen, für die dies nicht zutrifft (Tab. 8).

Eine Erklärung für die fehlende Klumpungsreaktion könnte die Ausbildung von Kapseln bei den getesteten S.aureus-Isolaten sein. Derartige Kapseln "maskieren" den Klumpungsfaktor. So verhielt sich nach KOENIG (1962) ein bekapselter S.aureus-Stamm im Klumpungstest negativ, während die unbekapselte Variante positiv reagierte. Dementsprechend bedienten sich SMITH et al. (1971) des Nachweises des Klumpungsfaktors als einer der Möglichkeiten, Kapselbildung nachzuweisen. Bei den von BECKER et al. (1987) aus Viertelgemelksproben isolierten klumpungsfaktornegativen S.aureus-Stämmen konnte allerdings keine Kapselbildung nachgewiesen werden.

2.6 Thermonuklease

Seit 1956 ist durch die Arbeiten von CUNNINGHAM et al. bekannt, daß S. aureus eine extrazelluläre Nuklease bildet, die eine hohe Hitzestabilität besitzt und daher auch als Thermonuklease bezeichnet wird. Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, daß mehr als 99 % aller geprüften S.aureus-Stämme die Fähigkeit zur Thermonukleasebildung besitzen (BARRY et al., 1973; BAIRD-PARKER, 1974; RAYMAN et al., 1975; SPERBER und TATINI, 1975; TATINI et al., 1976; SPERBER, 1977; PARK et al., 1980 und SANKARAN und LEELA, 1982). Der Nachweis der Thermonukleasebildung kann somit neben der Koagulasebildung als eines der Hauptkriterien zur Identifizierung S.aureus-verdächtiger Isolate angesehen werden.

Lange Zeit wurde angenommen, daß es sich bei der Thermo-
nuklease um ein spezifisches Merkmal von *S. aureus*
handelt. Aus neueren Arbeiten geht hervor, daß die Fähig-
keit Thermo-*nuklease* zu bilden, nicht nur auf die Spezies
S. aureus beschränkt ist. In der Familie der *Micrococca-*
ceae konnte die Bildung hitzestabiler Nukleasen inzwi-
schen bei verschiedenen koagulasenegativen Staphylokokken
wie *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. capitis*, *S. sciuri* (GRAMOLI
und WILKINSON, 1978) sowie bei *S. hyicus* subsp.
chromogenes, "*S. staphylolyticus*" und *S. caseolyticus*
(BECKER et al., 1984) und bei den beiden koagulaseposi-
tiven Spezies *S. intermedius* (HAJEK, 1976) und *S. hyicus*
hyicus (DEVRIESE et al., 1978) nachgewiesen werden. Nicht
nur innerhalb der Gattung *Staphylococcus* war Thermo-
nukleasebildung zu registrieren, sondern auch bei
Streptokokken (THOMAS und NAMBU DRIPAD, 1974; GUDDING,
1979; BISSONETTE et al., 1980; PARK et al., 1980; BATISH
et al., 1982) und bei aeroben Sporenbildnern (BISONETTE
et al., 1980; PARK et al., 1980; BECKER et al., 1984).

Untersuchungen an hitzestabile Nukleasen bildenden
Streptokokken (BECKER et al., 1987), aeroben Sporen-
bildnern (BECKER et al., 1984), *S. intermedius*-Stämmen
(LACHICA et al., 1979; GUDDING, 1983; GUDDING und NESS,
1985), *S. hyicus hyicus*-Stämmen (LACHICA et al., 1979;
GUDDING, 1983; BECKER et al., 1984; GUDDING und NESS,
1985; FLANDROIS und CHOMARAT, 1985; TAKEUCHI et al.,
1985) und koagulasenegativen Staphylokokken (GUDDING,
1983; BECKER et al., 1984) haben gezeigt, daß die Enzyme
der jeweiligen Gattung bzw. Spezies sich serologisch
voneinander abgrenzen lassen. Im Gegensatz hierzu konnten
FLANDROIS und CHOMARAT (1985) diese Beobachtung bei
S. intermedius-Stämmen nicht bestätigen. Den übrigen oben
genannten Untersuchungen zufolge besteht die Möglichkeit,
mit einem geeigneten Antiserum *S. aureus* zu identifi-
zieren und von den beiden anderen koagulasepositiven
Staphylokokkenspezies abzugrenzen.

Zum Thermonukleasenachweis sind verschiedene Verfahren entwickelt worden (BECKER, 1984), von denen sich die Methode nach LACHICA et al. (1971) und TATINI (1975) mit Toluidinblau O-DNA-Agar besonders bewährt hat (siehe Material und Methodik der vorliegenden Arbeit).

2.7 Hämolyseverhalten

Vier verschiedene Hämolsine (Toxine, Lysine) sind bisher bei *S.aureus* beschrieben worden. Sie werden als α - (de CHRISTMAS, 1888; BURNET, 1930), β - (WALBUM, 1922; GLENNY und STEVENS, 1935), γ - (SMITH und PRICE, 1938) und δ -Hämolysin (WILLIAMS und HARPER, 1947) bezeichnet. Bei allen vier Lysinen handelt es sich um Exotoxine mit Proteincharakter, die auf verschiedenen Wegen die Zellmembranen von Erythrozyten aber auch anderen Zellen schädigen können (GRÜN, 1964; BERNHEIMER, 1968). Aufgrund unterschiedlicher antigener Eigenschaften lassen sie sich mit geeigneten Antiseren differenzieren (ELEK und LEVY, 1950). Die serologischen Nachweisverfahren spielen allerdings bei der Routinediagnostik der Euterentzündungserreger im allgemeinen keine Rolle. Man verwendet stattdessen Rinderblutagar mit gewaschenen Rindererythrozyten, auf dem die im Zusammenhang mit Mastitiden besonders interessierenden β -Hämolysin-bildenden *S.aureus*-Stämme (siehe weiter unten) sofort erkannt werden können (GEDEK, 1972) und beurteilt die verschiedenen Hämolyseformen. α -Hämolysin wird häufig bei humanen Stämmen gefunden (WISEMAN, 1975), eventuell in Kombination mit δ -Hämolysin (ELEK und LEVY, 1950), vor allem bei Rinderstämmen auch zusammen mit β - oder δ - und β -Hämolysin (siehe Tab. 9). α -Hämolysin ist gegenüber Kaninchenerythrozyten besonders aktiv. Unter seiner Einwirkung kommt es zu einer relativ breiten Zone vollständiger Hämolyse, die gegen den unveränderten Nährboden unscharf abgegrenzt ist (ELEK und

LEVY, 1950). Ebenso wie Erythrozyten des Kaninchens werden auch die von Schaf, Ziege und Rind lysiert (ELEK und LEVY, 1950; GRÜN, 1964). α -Hämolysin soll für die gangränöse Form der Staphylokokkenmastitis bei Kühen, Schafen und Ziegen verantwortlich sein (SCHALM et al., 1971).

β -Hämolysin ist bei *S.aureus*-Stämmen des Rindes allein, vor allem aber in Kombination mit anderen Hämolysinen sehr häufig nachzuweisen (siehe Tab. 9). Zwischen der Euterpathogenität eines Stammes und dem β -Hämolysinsbildungsvermögen scheint ein enger Zusammenhang zu bestehen (NAIDU und NEWBOULD, 1975; RÖDER, 1985). Die direkte Toxizität dieses Hämolysins wird, falls es allein und nicht in Kombination mit anderen Hämolysinen gebildet wurde, allerdings kontrovers diskutiert. Während SLANETZ und BARTLEY (1953) mit Kulturfiltraten eines β -Hämolysinsbildners nur bei der Verwendung hoher Dosen eine Euterentzündung beobachteten, konnten NAIDU und NEWBOULD (1975) durch Euterinfusionen mit geringen Mengen eines β -Hämolysin bildenden Staphylokokkenstammes Mastitiden, auch mit akutem Verlauf, auslösen. β -Hämolysin soll die entzündliche Wirkung des δ -Toxins verstärken (SLANETZ und BARTLEY, 1953). Das Toxin bewirkt auf Schafblutagar, ähnlich wie auf Rinderblutagar (GEDEK, 1972) eine breite, zunächst unvollständige Hämolysezone, die gegen den unveränderten Nährboden scharf abgegrenzt ist (ELEK und LEVY, 1950; WISEMAN, 1965). Auffällig ist das sogenannte hot-cold-lysis-Phänomen (WALBUM, 1922): Nach Aufbewahrung der zunächst bei 37°C bebrüteten Platten bei Kühlschranktemperaturen (ca. 4°C) geht die oben beschriebene unvollständige in eine vollständige Hämolyse über. Vollständige Hämolyse nach α -Hämolysineinwirkung und solche nach hot-cold-lysis unterscheiden sich durch den unscharfen bzw. scharfen Übergang in den unveränderten Nährboden. Erklärungsversuche für das hot-cold-lysis Phänomen finden sich bei WISEMAN (1975).

bei aus Mastitissekret oder Milch isolierten S.aureus-Stämmen

tionen			Autor(en)
ßð	aßð	keine	
17	59	n.a.	ELEK und LEVY, 1950
9	27	n.a.	REID und WILSON, 1959
62,4	22,1	n.a.	LOKEN und HOYT, 1962
n.g.	n.g.	n.a.	ZEMELMAN und LONGERI, 1965
n.g.	n.g.	n.a.	TERPLAN und GEDEK, 1965
5	87	n.a.	GEDEK und KOPP, 1967
n.a.	n.a.	n.a.	HAJEK und MARSALEK, 1969a
n.g.	n.g.	n.a.	HEESCHEN et al., 1970
n.a.	n.a.	n.a.	OEDING et al., 1971
n.g.	n.g.	n.a.	UNTERMANN et al., 1973
n.g.	n.g.	n.a.	BRÜCKLER et al., 1981a
n.g.	n.g.	11,6	BECKER et al., 1987

γ - und δ -Hämolysin sind in der Routinediagnostik weniger bedeutsam. Das nach GUYONNET et al. (1968) bei *S. aureus*-Stämmen von Tieren relativ häufig nachzuweisende γ -Toxin wird unter anderem durch Agar gehemmt, so daß zunächst seine Existenz bezweifelt wurde (ELEK und LEVY, 1950). δ -Hämolysineinwirkung äußert sich auf Blutplatten in Form einer schmalen Zone vollständiger Hämolyse mit nach WILLIAMS und HARPER (1947) scharfer, nach ELEK und LEVY (1950) unscharfer Begrenzung gegen den unveränderten Nährboden. Eine visuelle Unterscheidung von α -Hämolysin ist, vor allem bei gleichzeitiger Anwesenheit von β -Hämolysin, nicht ohne weiteres möglich (SCHALM et al., 1971).

Abschließend sei noch darauf hingewiesen, daß auch koagulasenegative Staphylokokken Hämolysine bilden können. Eine Zusammenfassung der bisher in diesem Zusammenhang durchgeführten Untersuchungen findet sich bei WISEMAN (1975) und MÖLLBY (1983).

2.8 Pigmentbildung

Aufgrund unterschiedlicher Koloniefarben differenzierte man in den Anfängen der Staphylokokkendiagnostik die Arten *S. pyogenes aureus* (goldene Kolonien), *S. pyogenes albus* (weiße Kolonien) (ROSENBACH, 1884) und *S. pyogenes citreus* (gelbe Kolonien) (PASSET, 1885). Eine diagnostisch verwertbare Beziehung zwischen Pigmentierung und Pathogenität eines Isolates wurde zwar vermutet (BONIECE et al., 1957), erscheint aber sehr unwahrscheinlich. So fand bereits PASSET (1885) in Material aus Abszessen Staphylokokken unterschiedlicher Pigmentierung. Ähnliches gilt auch für Isolate aus Milch und Euterentzündungen. REID und WILSON (1959) beobachteten zwar bei allen koagulasepositiven Staphylokokken, die im Sekret von an akuten Mastitiden leidenden Tieren nachgewiesen worden waren,

Tabelle 10: Vorkommen verschiedener Pigmente bei aus Mastitissekret oder Milch isolierten S.aureus-Stämmen (nach Literaturangaben)

Medium	Anzahl getesteter Stämme	Anzahl golden %	Pigmente			Autor(en)
			¹ gelb %	² weiß %		
Chapman's Medium 110	404	95,8	1,5	2,7		REID und WILSON 1959
Chapman's Medium 110	404	95,8	2,7	1,5		ZEMELMAN und LONGERI, 1965
Eigelbagar	225		95,6 ³			GEDEK und KOPP, 1967
Milchagar	225		89,3 ³			GEDEK und KOPP, 1967
Eigelbagar	978	28,6	n.a.	n.a.		HEESCHEN et al. 1970
Eigelbagar	225	n.a.	95,5	4,4		GEDEK, 1972
Milchagar	225	n.a.	89,3	10,7		GEDEK, 1972
Glyzerin- monoazetat- agar	225	n.a.	92,4	7,5		GEDEK, 1972
Lysozym- agar	120	n.a.	76,7	5,3		UNTERMANN et al., 1973
Staphylok. Medium 110	276 ⁴	25,4	49,4	25,3		NISKANEN und KOIRANEN, 1977
Rinder- blutagar	267	27,3	36,3	36,3		BECKER et al., 1987

1: inklusive orange, 2: inklusive elfenbein- bzw. creme-farben, 3: nicht angegeben welches Pigment 4: aus Lebensmittel und Mastitissekret isoliert, n.a.: nicht angegeben

orangefarbene oder gelbe Pigmentierung. Von den aus nicht erkrankten Eutern isolierten Stämmen wiesen allerdings 57 % ebenfalls derartige Koloniefarben auf. Eine Zusammenstellung weiterer ähnlicher Untersuchungen an Kulturen aus Milch und Mastitissekreten findet sich in Tab. 10.

Nach Untersuchungen von MARSHALL und WILMOTH (1981a,b) handelt es sich bei den Farbstoffen von *S.aureus* um eine Mischung verschiedener Triterpenoid-Carotenoide. Die Farbdifferenzen zwischen einzelnen Stämmen sollen aufgrund quantitativer und qualitativer Unterschiede in der Zusammensetzung der Carotenoide zustande kommen. Nicht eindeutig geklärt ist die Frage, ob weiße Kolonien pigmentiert sind. O'CONNOR et al. (1966) vermuteten, daß weißen Kolonien jegliche Pigmentierung fehlt. Andererseits konnten MARSHALL und WILMOTH (1981a,b) bei weißen Kolonien bildenden *S.aureus*-Stämmen farbloses Carotenoid nachweisen.

Die charakteristische Pigmentierung ist keine unveränderliche Eigenschaft eines Stammes, sondern von zahlreichen Faktoren abhängig, unter denen vor allem die CO_2 - und O_2 -Gehalte der Atmosphäre bei der Bebrütung, aber auch die Zusammensetzung des Nährbodens eine wesentliche Rolle spielen (O'CONNOR et al., 1966). Auch diese Tatsachen sprechen dagegen der diagnostischen Bedeutung der Pigmentbildung allzu große Bedeutung beizumessen.

2.9 Eigelbfaktor

GILLESPIE und ALDER (1952) beobachteten, daß viele aus humanklinischem Material isolierte koagulasepositive Staphylokokken eine als Eigelbreaktion bezeichnete Trübung in eigelbhaltigen Medien hervorriefen. Ihre Arbeit initiierte zahlreiche Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus des Eigelbfaktors (z.B. OWENS, 1974; OWENS und JOHN, 1975) und zu seiner diagnostischen Bedeutung bei der Isolierung von S.aureus aus klinischem Material und aus Lebensmittelproben (INNES, 1960; BAIRD-PARKER, 1961; SINELL und BAUMGART, 1967). Es zeigte sich allerdings schon bald, daß der Eigelbfaktor ein nur wenig stabiles Merkmal von S.aureus darstellt. So hatten bereits GILLESPIE und ALDER (1952) nur bei 80 % der von ihnen geprüften Isolate eine positive Reaktion registriert. SPERBER (1977) faßt die seither durchgeführten Untersuchungen an humanklinischen, tierischen und aus Lebensmittel isolierten Stämmen zusammen und kam zu dem Ergebnis, daß nur 69 % aller S.aureus-Stämme, aber 23 % aller koagulasenegativen Staphylokokken den Eigelbfaktor besaßen. In Tab. 11 findet sich eine Zusammenstellung zum Vorkommen des Eigelbfaktors bei S.aureus-Kulturen aus Mastitissekreten und Milchproben.

Tabelle 11: Vorkommen des Eigelbfaktors bei aus Mastitissekret oder Milchproben isolierten S.aureus-Stämmen (nach Literaturangaben)

Anzahl getesteter Stämme	Anzahl Eigelbpositiver Stämme (%)	Autor(en)
70	61 (87,1)	REID und WILSON, 1959
97	93 (95,9)	ABO-ELNAGA und KANDLER, 1965
225	38 (16,9)	GEDEK und KOPP, 1967
236	45 (19,1)	GRÜN, 1968
130	122 (94)	HAJEK und MARSALEK, 1969a
173	88 (51)	OEDING et al., 1971
57	26 (45,6)	GARCIA LOPEZ und MORENO GARCIA, 1980
104	57 (54,8)	JONSSON und HOLMBERG, 1981
267	92 (34,5)	BECKER et al., 1987
23	0 (0)	O'TOOLE, 1987

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Material und Methodik

3.1.1 Untersuchungsmaterial

Für die Untersuchungen standen 700 Viertelgemelksproben von 700 Kühen aus 612 landwirtschaftlichen Betrieben im Allgäu zur Verfügung. Die Betriebe liegen im Einzugsgebiet des Tiergesundheitsdienstes (TGD) Bayern, Region Schwaben- Süd (Kempten), das östlich durch den Lech, im Süden und Westen durch die deutsche Staatsgrenze, bzw. die Landesgrenze zu Baden-Württemberg und im Norden etwa 30 km südlich der Verbindungslinie Ulm und Augsburg begrenzt wird. Das Tätigkeitsfeld des TGD Kempten umfaßt etwa 14 000 landwirtschaftliche Betriebe mit ca. 550 000 Rindern, darunter 285 000 Milchkühe. Die aseptisch entnommenen Viertelgemelksproben stammten aus Routine-, Kontroll- und Mastitisuntersuchungen, die der TGD Kempten im Rahmen freiwilliger Untersuchungen durchführt.

3.1.2 Nährböden und Reagenzien

Zusammensetzung und Herkunft der verwendeten Nährböden und Reagenzien sind der Tabelle 12 zu entnehmen.

Tabelle 12: Zusammensetzung und Herkunft der verwendeten Nährböden und Reagenzien

Rinderblutagar

Bacto Tryptose Blood Agar Base,

(Difco 0232-01-9)

Rindererythrozyten (3x gewaschen)	5 %
-----------------------------------	-----

Hammelblutagar

Columbia Agar Base, (Oxoid CM 331)	39 g
------------------------------------	------

Agar Nr. 1, (Oxoid L 11)	5 g
--------------------------	-----

Äskulin, (Merck 848)	1 g
----------------------	-----

Aqua dest.	1000 ml
------------	---------

Schafblut, defibr., (Oxoid FSR 1055)	5-7 %
--------------------------------------	-------

Bouillon

Hirn-Herz-Dextrose-Bouillon (BHI)

(Oxoid CM 225)

Nähragar mit Eigelb

Nähragar, (Oxoid CM 3)	1000 ml
------------------------	---------

Eigelb-Emulsion (konzentriert), (Oxoid SR 47)	50 ml
--	-------

Nähragar mit Stärke

Nähragar s.o.	1000 ml
---------------	---------

Stärke löslich, (Merck 1253)	10 g
------------------------------	------

Fortsetzung Tabelle 12:

Toluidinblau O-DNA-Agar

Agarmedium:

NaCl, (Merck 6400)	10,0 g
Agar Nr. 1, (Oxoid L 11)	10,0 g
Bacto DNA, (Difco 3231-12-1)	0,3 g
Tris-Puffer	1000 ml
Tris-Puffer:	
Tris(hydroxymethyl)aminomethan, (Merck 8382)	6,057 g
Calciumchlorid, (Merck 2387)	0,11 g
Aqua dest.	1000 ml

Lösen des Agarmediums in Tris-Puffer
im Dampftopf (1,5 h), anschließend Zugabe
einer Toluidinblau O-Lösung (0,1 mol/l)
(Serva 36692)

3,0 ml

P-Agar

Fleischpepton, (Merck 7224)	10,0 g
Hefeextrakt, (Oxoid L 21)	5,0 g
NaCl, (Merck 6400)	5,0 g
Glucose, (Merck 8342)	1,0 g
Agar Nr. 1, (Oxoid L 11)	15,0 g
Aqua dest.	1000 ml

Kaninchenplasma

Bacto Coagulase Plasma EDTA,
(Difco 0803-46-4)

Rinderplasma

Titriplex III (EDTA-Stab.) (Merck 1192)	1 mg
Rinderblut	1 ml

Fortsetzung Tabelle 12:

Staphyslide

(bioMérieux 55081)

Penicillin G-Jod-Jodkalilösung

Penicillin G-Kalium, (Bayer 2323)	0,2 g
Jod-Jodkali-Stammlösung	2,0 ml
Aqua dest.	18,0 ml

Jod-Jodkali-Stammlösung:

Kaliumjodid, (Merck 5048)	53,10 g
Jod, (Merck 4760)	2,03 g
Phosphatpuffer pH 7	1000 ml

KOH-Lösung

Kaliumhydroxid-Plätzchen, (Merck 5033)	3 g
Aqua dest.	100 ml

H₂O₂-Lösung

H ₂ O ₂ -Lösung (30%ig), (Merck 8597)	1 ml
Aqua dest.	10 ml

Tusche

Pelikan Nr. 17

MR-VP-Bouillon

Methylrot-VOGES-PROSKAUER-Bouillon,
(Merck 5712)

zu 5 ml in Röhrchen abgefüllt

1-Naphthol-Lösung

1-Naphthol, (Merck 6223)	5 g
Ethanol absolut z.A., (Merck 983)	100 ml

Fortsetzung Tabelle 12 :

KOH-Lösung

Kaliumhydroxid-Plätzchen, (Merck 5033)

40 g

Aqua dest.

ad 100 ml

Kreatinkristalle

Creatin Monohydrat, (Fluka 27900)

PBB-Bouillon

Bacto Purple Broth Base, (Difco 0227-01-6)

zu 9 ml in Röhrchen abgefüllt

Maltose

(Merck 5910)

D(-)-Mannit

(Merck 5982)

Wasseragar

Agar Nr. 1, (Oxoid L 11)

2 g

Aqua dest.

100 ml

3.1.3 Auswahl verdächtiger Kolonien

Aus den Proben wurden Ausstriche auf Rinderblutagar angelegt und 24 h bei 37 °C bebrütet. Die Auswahl verdächtiger Kolonien erfolgte anhand der Koloniemorphologie und des Hämolyseverhaltens. Verdächtiges Material wurde auf Rinderblutagar überimpft und 24 h bei 37 °C inkubiert.

3.1.4 Differenzierung verdächtiger Kolonien

Die Isolate wurden zunächst mikroskopisch, dann auf ihr Gramverhalten und die Reaktion im Katalasetest geprüft.

3.1.4.1 Mikroskopische Untersuchung

Die mikroskopische Untersuchung hinsichtlich der Bakterienzellmorphologie erfolgte im Nativpräparat (Phasenkontrast).

3.1.4.2 Prüfung des Gramverhaltens

Das Gramverhalten wurde mit dem KOH-Test (GREGERSEN, 1978) geprüft. Hierzu verreibt man eine Kolonie auf einem Objektträger in einem Tropfen 3%iger KOH-Lösung. Bei gramnegativen Bakterien kommt es zu einer Schleimbildung, bei grampositiven Bakterien wird die Flüssigkeit wäßrig-trüb.

3.1.4.3 Nachweis der Katalase

Koloniematerial wird auf einem Objektträger in einem Tropfen 3%iger Wasserstoffperoxidlösung verrieben. Bei Anwesenheit katalasepositiver Keime kommt es durch die Aktivität des Enzyms zur Schaumbildung.

3.1.5 Weitere Differenzierung grampositiver, katalasepositiver Kokken

Diejenigen Isolate, die sich in den unter 3.1.4 beschriebenen Untersuchungen als grampositive, katalasepositive Kokken erwiesen, wurden weiterdifferenziert.

3.1.5.1 Nachweis der Thermonuklease

Der Nachweis hitzestabiler *S. aureus*-Nuklease, Thermonuklease (TNase) erfolgte in Toluidinblau O-DNA-Agar (LACHICA et al., 1971; TATINI, 1975). In den Nährboden werden Löcher ($\varnothing$ 2 mm) zur Aufnahme des Probenmaterials gestanzt. Einige ml einer Bouillonkultur (BHI, 24 h/37°C) werden 15 min bei 100°C im Wasserbad erhitzt, hieraus nach dem Abkühlen 7 µl in ein ausgestanztes Loch pipettiert und bei 37°C bebrütet. Durch die Aktivität des Enzyms (DNA-Spaltung) und die metachromatischen Eigenschaften des Toluidinblaus kommt es in der Diffusionszone der TNase um das Loch zu einer Rosafärbung des sonst blauen Agars.

Mit Hilfe eines Antiserums gegen *S. aureus*-TNase kann letztere von hitzestabilen Nuklasen anderer Bakterien abgegrenzt werden (LACHICA et al., 1979; BECKER et al., 1984). Hierzu wurde im Abstand von 2 mm zum ersten ein weiteres Loch in den Agar gestanzt und mit 7 µl Antiserum beschickt. Bei Anwesenheit von *S. aureus*-TNase kommt es im Überlappungsbereich der Diffusionszonen nicht zur Ausbildung einer kreisförmigen, sondern nur zu einer halbkreisförmigen rosa Verfärbungszone um das mit Antigen gefüllte Loch. Zur Kontrolle wurde ein bekannter TNasebildender *S. aureus*-Stamm mitgeführt. Die Beurteilung des Testes erfolgte nach 4 h bzw. im Falle eines negativen Resultates nach 24 h.

3.1.5.2 Nachweis der Koagulase

Der Koagulasenachweis erfolgte entsprechend dem International Standard (ISO 1983).

In sterilen Röhrchen (ϕ 9 mm) werden 0,3 ml EDTA-stabilisiertes Kaninchenplasma mit 0,1 ml einer 24 h/ 37 °C alten Bouillonkultur (BHI) vermischt und bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Abweichend von der oben genannten Norm wurde, um das Verfahren abzukürzen, der Test zusätzlich mit einer Suspension der zu testenden Kolonie in physiologischer Kochsalzlösung durchgeführt. Mit 0,1 ml dieser Suspension wurden 0,3 ml Kaninchenplasma in den oben genannten Röhrchen vermischt und bei 37 °C im Wasserbad bebrütet.

Die Beurteilung der Koagulation erfolgte nach 4 h, im Falle eines zu diesem Zeitpunkt negativen Resultates nach bis zu weiteren 20 h. Um unspezifische Reaktionen ausschließen zu können, wurden als Positivkontrolle ein bekannter koagulasepositiver *S. aureus*-Stamm und als Negativkontrolle ein Ansatz mit steriler BHI- bzw. NaCl-Lösung mitgeführt.

3.1.5.3 Nachweis des Klumpungsfaktors

Der Nachweis des Klumpungsfaktors wurde konventionell mit Kaninchen- und Rinderplasma sowie mit einem indirektem Hämagglutinationstest (Staphyslide) durchgeführt.

3.1.5.3.1 Konventioneller Nachweis mit Kaninchen- und Rinderplasma

Koloniematerial wurde auf einem Objektträger in einem Tropfen Kaninchenplasma verrieben und hinsichtlich einer Klumpenbildung beurteilt. Bei 50 willkürlich ausgewählten Isolaten erfolgte der Test zusätzlich mit Rinderplasma.

3.1.5.3.2 Nachweis mittels indirektem Hämagglutinationstest

Der kommerziell verfügbare Staphyslide-Test ist dem Prinzip nach ein indirekter Hämagglutinationstest. Hammelerythrozyten werden mit Fibrinogen sensibilisiert, das mit dem Klumpungsfaktor (Fibrinogenrezeptor), falls dieser vorhanden ist, reagiert. Koloniematerial wird mit einem Tropfen Reagenz verrieben und die Agglutination der Erythrozyten innerhalb 15 Sekunden beurteilt. Um unspezifische Reaktionen ausschließen zu können, wird eine negative Kontrolle (nicht sensibilisierte Erythrozyten) mitgeführt. Agglutinieren auch die Erythrozyten der Kontrolle, so ist das Ergebnis nicht verwertbar.

Obwohl es sich bei den angesprochenen Agglutinationen nicht um echte Agglutinationen im immunologischen Sinn handelt, werden diese Bezeichnungen im folgenden beibehalten.

3.1.5.4 Prüfung auf Kapselbildung

Die Untersuchung auf Kapselbildung erfolgte bei 100 zufällig ausgewählten koagulasepositiven Kulturen (50 Klumpungsfaktorpositiv, 50 Klumpungsfaktornegativ) nach den bei KITZROW (1972) beschriebenen Verfahren. Als Kriterien wurden eine mikroskopisch sichtbare Kapsel und die Bildung schleimiger Kolonien auf Blutagar angesehen. Zur mikroskopischen Darstellung wurde auf einem Objektträger ein Tropfen Tusche mit Koloniematerial dünn ausgestrichen und getrocknet. Anschließend wurde das Präparat mit Ölimmersion mikroskopisch untersucht. Bei bekapselten Staphylokokken zeigt sich die Kapsel als weißer Ring um den dunklen Zelleib.

Die Beurteilung schleimigen Wachstums erfolgte auf Hammelblutagar (HBA) nach einer Bebrütung von 18 h bei 37 °C. Bekapselte Staphylokokken bilden auf HBA schleimig-glänzende, mehrere Millimeter große Kolonien.

3.1.5.5 Nachweis der Acetoinbildung

Die Prüfung auf Acetoinbildung wurde an insgesamt 75 koagulasepositiven, weiß pigmentierten Isolaten, von denen 55 im Klumpungstest negativ, 20 positiv reagiert hatten, durchgeführt. Außerdem wurden die vier in Tab. 15 dargestellten, sich atypisch verhaltenden Kulturen, untersucht. Mit Bouillonkultur des zu prüfenden Isolates beimpfte MR-VP-Bouillon wurde bei 37 °C bebrütet und nach 48 h folgendermaßen auf Acetoinbildung untersucht: Zu 1 ml der Kultur wurden 0,2 ml 40%ige KOH-Lösung, 0,6 ml 5%ige 1-Naphthol-Lösung und einige Kreatinkristalle gegeben und vermischt. Eine positive Reaktion zeigt sich spätestens nach 60 min als Farbumschlag nach rot, während bei einer negativen Reaktion keine vergleichbare Farbveränderung zu beobachten ist.

3.1.5.6 Nachweis der Maltosespaltung unter aeroben und der Mannitspaltung unter aeroben und anaeroben Bedingungen

Die Untersuchung auf Säurebildung aus Maltose und Mannit erfolgte ebenfalls an den unter 3.1.5.5 genannten Isolaten. Als Basismedium diente Purple-Broth-Base (PBB) mit Bromkresolpurpur als Indikator. Maltose und Mannit wurden in Aqua dest. gelöst, sterilfiltriert und dem abgekühlten, autoklavierten Medium in einer Endkonzentration von 1 % zugegeben. Das in Röhrchen abgefüllte Medium wurde mit einem Tropfen Bouillonkultur des zu untersuchenden Isolates beimpft. Zur Prüfung des Mannitabbaus unter anaeroben Bedingungen wurden die Röhrchen nach der Beimpfung mit sterilem 2%igem Wasseragar überschichtet. Nach einer Bebrütung von 24 - 48 h bei 37°C erfolgte die Beurteilung der Reaktion. Ein Farbumschlag des gesamten Nährmediums nach gelb wurde als positiv bewertet, nicht eindeutig positive Röhrchen wurden anschließend weiter inkubiert und nach weiteren 48 h beurteilt. Kein Farbumschlag wurde als negative Reaktion bewertet.

3.1.5.7 Beurteilung des Hämolyseverhaltens

Hämolyseverhalten (vollständige Hämolyse mit unscharfer Abgrenzung zum unveränderten Nährboden; unvollständige Hämolyse mit scharfer Abgrenzung zum unveränderten Nährboden und Ausbildung einer vollständigen Hämolyse nach Aufbewahrung bei 4°C (hot-cold-lysis); Kombination aus vollständiger und unvollständiger Hämolyse; keine makroskopisch sichtbare Veränderung des Nährbodens) wurde auf Rinderblutagar nach einer Bebrütung von 24 h bei 37°C beurteilt.

3.1.5.8 Nachweis der Penicillinase

Der Nachweis der Penicillinase (β -Lactamase) erfolgte nach einer bei GEDEK (1978) beschriebenen Methode. Eine stärkehaltige Agarplatte wird mit Material des zu testenden Keimes im Stichverfahren beimpft. Nach 18 h Bebrütung bei 37 °C werden 2 ml einer Penicillin G - haltigen Jod-Jodkali-Lösung auf den Nährboden verbracht und gleichmäßig über die Oberfläche verteilt. Der Agar verfärbt sich aufgrund der Jod-Stärke-Reaktion dunkelblau bis schwarz. Nach 15 - 30 min (Zimmertemperatur) zeigen Penicillinasebildner deutliche kreisförmige Entfärbungszonen um die Kolonie.

3.1.5.9 Prüfung des Enterotoxinbildungsvermögens

50 klumpungsfaktornegative und 50 klumpungsfaktorpositive koagulasepositive Isolate wurden mit einem enzymimmunologischen Verfahren (SCHREINER, 1985; JUNG, 1988) sowie mittels der radialen Doppeldiffusion nach OUCHTERLONY, modifiziert nach SOMMERFELD und TERPLAN (1975) auf Enterotoxinbildungsvermögen (SEA-SEE) geprüft. Bei dem enzymimmunologischen Verfahren wurden 20 ml einer Bouillonkultur (BHI) 48 h bei 37 °C in einem 250 ml-Erlenmeyerkolben bebrütet und anschließend 30 min bei 12 000 upm/4 °C zentrifugiert. Die Untersuchung des Kulturüberstandes erfolgte nach den von SCHREINER (1985) und JUNG (1988) beschriebenen Methoden. Die Empfindlichkeit dieses Verfahrens liegt bei 0,1 ng/ml.

Stämme, die nach dem Ergebnis dieses Tests Enterotoxine bildeten, wurden mit der radialen Doppeldiffusion bestätigt. Da die Empfindlichkeit dieses Verfahrens mit 0,1 µg/ml geringer ist als die der enzymimmunologischen Methode, wurde durch das Sackkulturverfahren nach DONNELLY (1967) eine höhere Toxinkonzentration erreicht

(Bebrütung für 48 h/37°C im Schüttelbrutschrank). Durch Einengung des zentrifugierten (30 min bei 12 000 upm/4°C) Kulturüberstandes im Rotationsverdampfer wurde eine weitere Erhöhung der Toxinkonzentration erzielt.

3.1.5.10 Nachweis des Eigelbfaktors

Von einer 24 h bei 37°C bebrüteten Bouillonkultur (BHI) wurde mit einer Impfnadel Material in eigelbhaltigen Nähragar verbracht (Stichbeimpfung) und 24 - 48 h bei 37°C bebrütet. Als eigelbpositiv wurde eine Kultur bewertet, wenn unmittelbar um die Kolonie ein kristalliner, ölfilmartiger Saum und um diesen ein durchsichtiger Hof vorhanden waren.

3.1.5.11 Beurteilung der Pigmentbildung

Pigmentbildung (goldene, gelbe, weiße Kolonien) wurde auf Rinderblutagar nach einer Bebrütung von 24 h bei 37°C beurteilt.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Identifizierung von *Staphylococcus aureus*

Aus Viertelgemelksproben von 444 Betrieben wurden 444 grampositive, katalasepositive Kokken isoliert (je Betrieb 1 Isolat). Diejenigen Kulturen, die eine positive Reaktion im TNase-Test zeigten und deren TNase-Aktivität ein Antiserum gegen *S. aureus*-TNase hemmte, wurden als *S. aureus* (387 Stämme), solche, die keine TNase-Aktivität zeigten bzw. deren TNase nicht mit dem Antiserum reagierte, als "sonstige Micrococcaceae" (57 Kulturen) definiert.

3.2.2 Vorkommen der Thermonuklease

Im TNase-Test reagierten 390 Isolate positiv. Bei 387 davon reagierte die TNase mit *S. aureus*-TNase-Antiserum. Drei Isolate waren zwar im TNase-Test positiv, wurden jedoch nicht durch das Antiserum gehemmt.

3.2.3 Vorkommen der Koagulase

Insgesamt 388 Stämme zeigten eine mit dem Verfahren nach ISO (1983) positive Reaktion im Koagulasetest. Einer dieser Stämme war im Thernonuklease- und im Klumpungstest negativ gewesen. Bei sechs Isolaten erfolgte die Bildung eines Koagulums erst nach 24 h, bei den übrigen bereits nach 4 h. Der parallel durchgeführte Test mit einer Keimsuspension in physiologischer Kochsalzlösung anstelle der BHI-Kultur verlief bei 386 der oben genannten Stämme ebenfalls positiv. Bei diesem Verfahren konnte die Beurteilung der Koagulation in der Regel erst nach 6 h erfolgen, da nur wenige Stämme schon nach 4 h ein Koagulum bildeten. Etwa 1/4 der Stämme zeigte nach 6 h ein negatives Resultat und konnte erst nach 24 h beurteilt werden. Die beiden nicht positiven Isolate besaßen den Klumpungsfaktor.

3.2.4 Vorkommen des Klumpungsfaktors

Insgesamt 172 Stämme reagierten im Klumpungstest positiv (mit dem konventionellen Verfahren ermittelt). Einer dieser Stämme war zwar thermonukleasepositiv, doch reagierte das Enzym nicht mit dem Antiserum. Der Koagulase-Test verlief bei diesem Isolat negativ (3.2.8, Tab. 15, Isolat Nr. 3).

Der Vergleich zwischen der konventionellen Durchführung des Klumpungstests (Plasmaagglutination) und dem indirekten Hämagglutinationstest (Staphyslide) erbrachte bei zwei Isolaten unterschiedliche Ergebnisse. Beide koagulasepositive, in der Plasmaagglutination negative Stämme verhielten sich im Staphyslide-Test positiv. Sowohl der konventionelle Nachweis mit Kaninchenplasma als auch der indirekte Hämagglutinationstest ergaben in allen Fällen eindeutig interpretierbare Resultate. Allerdings war der Staphyslide-Test wegen der deutlicheren Agglutination besser auszuwerten. Bei zwei von 50 willkürlich ausgewählten Stämmen konnten die mit Kaninchenplasma erzielten positiven Resultate nach Verwendung von Rinderplasma nicht bestätigt werden.

3.2.5 Kapselbildung

100 koagulasepositive *S.aureus*-Stämme (50 klumpungsfaktorpositiv, 50 klumpungsfaktornegativ) wurden auf Vorhandensein von Kapseln geprüft. Weder bei der mikroskopischen Untersuchung im Tuschepräparat noch auf Hammelblutagar konnte Kapselbildung nachgewiesen werden.

3.2.6 Zusammenfassung der Ergebnisse zum Vorkommen von Thermonuklease, Koagulase und Klumpungsfaktor

Wie aus Tab. 13 ersichtlich, kamen bei insgesamt 216 S.aureus-Stämmen Koagulase und Klumpungsfaktor nicht gleichzeitig vor.

Tabelle 13: Vorkommen von Koagulase und Klumpungsfaktor
bei 387 S. aureus-Stämmen¹

koagulasepositive ² , klumpungsfaktorpositive ² Stämme (%)	koagulasepositive ² , klumpungsfaktornegative ² Stämme (%)
171 (44,2)	216 (55,8)

1: TNase-positiv, Reaktion mit S.aureus-TNase-Antiserum

2: mit dem konventionellen Verfahren ermittelt

In Tab. 14 wird das Vorkommen von TNase, Koagulase und Klumpungsfaktor zusammengefaßt.

Tabelle 14: Vorkommen von Klumpungsfaktor, Koagulase und TNase

	S.aureus ¹ n=387 (%)	Micrococcaceae ² n=57 (%)
TNase	387 (100)	3 (5,3)
Koagulase	387 (100)	1 (1,8)
Klumpungsfaktor	171 (44,2)	1 (1,8)

1: TNase-positiv, Reaktion mit S.aureus-TNase-Antiserum

2: außer S.aureus

3.2.7 Ergebnisse der Prüfung auf Acetoinbildung und Maltose- bzw. Mannitabbau

Alle 75 koagulasepositiven Isolate, die eine positive bzw. negative Reaktion im Klumpungstest und eine weiße Pigmentierung aufwiesen, bildeten Acetoin und bauten Maltose unter aeroben sowie Mannit unter aeroben und anaeroben Bedingungen ab.

Die Ergebnisse der vier sich atypisch verhaltenden Kulturen finden sich unter 3.2.8 (Tab. 15).

3.2.8 Ergebnisse der sich atypisch verhaltenden Isolate

Zur besseren Übersichtlichkeit werden in Tab. 15 die sich hinsichtlich der drei geprüften Kriterien atypisch verhaltenden Isolate nochmals zusammengefaßt. Die Isolate Nr. 1, 2 und 3 (Tab. 15) bildeten zwar stark TNase, doch reagierte diese nicht mit dem *S. aureus*-TNase-Antiserum. Isolat Nr. 3 war im Klumpungstest positiv, während Nr. 1 und 2 weder Klumpungsfaktor noch Koagulaseaktivität aufwiesen. Isolat Nr. 4 (3.2.3) war zwar koagulasepositiv, bildete aber weder TNase noch besaß es einen Klumpungsfaktor.

Die Isolate 1, 2 und 3 bildeten weder Acetoin noch waren sie zum Abbau von Maltose oder Mannit in der Lage. Isolat Nr. 4 reagierte in allen drei Tests positiv (Tab. 15).

Tabelle 15: Übersicht der sich atypisch verhaltenden Isolate

Tests	Isolate			
	1	2	3	4
TNase	+	+	+	-
Koagulase	-	-	-	+
Klumpungsfaktor	-	-	+	-
Hämolysin	-	-	-	β
Pigmentbildung	-	-	-	-
Acetoin	-	-	-	+
Maltose	-	-	-	+
Mannit aerob	-	-	-	+
" anaerob	-	-	-	¹ +

1: Reaktion verzögert

3.2.9 Ermittlung einiger sonstiger Eigenschaften (außer Koagulase, Klumpungsfaktor, TNase)

3.2.9.1 Hämolyseverhalten

Die meisten *S.aureus*-Stämme (89,4%) riefen eine Kombination aus vollständiger ("α-Hämolysin") und unvollständiger Hämolyse (β-Hämolysin, hot-cold lysis) hervor. Eine Zusammenstellung ist der Tab. 16 zu entnehmen.

Tabelle 16: Hämolyse auf Rinderblutagar

Hämolyse/Hämolysine	Anzahl der Stämme (%)	
	<i>S.aureus</i> ¹ n=387	<i>Micrococcaceae</i> ² n=57
vollständig/ "α-Hämolysin"	9 (2,3)	30 (52,6)
unvollständig (hot-cold-lysis)/ β-Hämolysin	21 (5,4)	1 (1,8) ³
kombiniert/ "α"+β-Hämolysin	346 (89,4)	0
nicht nachweisbar	11 (2,9)	26 (45,6)

1: TNase-positiv, Reaktion mit *S.aureus*-TNase-Antiserum

2: außer *S.aureus*

3: 3.2.8, Tab. 15, Isolat Nr. 4

3.2.9.2 Penicillinase

Penicillinasebildungsvermögen wurde bei insgesamt 68 Isolaten, davon 66 *S. aureus*-Stämmen, nachgewiesen. Eine Zusammenstellung zur Verteilung des Merkmals ist Tab. 17 zu entnehmen.

Tabelle 17: Vorkommen der Penicillinase

	Penicillinase- positiv (%)
387 <i>S. aureus</i> -Stämme ¹	66 (17,0)
57 <i>Micrococcaceae</i> ²	2 (3,5)
Total: 444 Isolate	68 (15,3)

1: TNase-positiv, Reaktion mit *S. aureus*-TNase-Antiserum

2: außer *S. aureus*

3.2.9.3 Enterotoxinbildung

Bei 100 koagulasepositiven *S. aureus*-Stämmen (50 klumpungsfaktorpositiv: Gruppe 1; 50 klumpungsfaktornegativ: Gruppe 2) wurde ein Enterotoxinnachweis durchgeführt. In Gruppe 1 bildeten zwei Stämme Enterotoxin vom Typ C, in Gruppe 2 zwei Stämme Enterotoxin vom Typ D und ein Stamm Enterotoxin vom Typ A.

3.2.9.4 Eigelbfaktor

72 der 444 Isolate zeigten eine positive Eigelbreaktion. Von diesen 72 Kulturen konnten 59 als *S.aureus* (TNase-positiv, Reaktion mit *S.aureus*-TNase-Antiserum) identifiziert werden.

Eine Zusammenstellung zur Verteilung des Merkmals ist Tab. 18 zu entnehmen.

Tabelle 18: Vorkommen des Eigelbfaktors

	Eigelbfaktor- positiv (%)
387 <i>S.aureus</i> -Stämme ¹	59 (15,2)
57 <i>Micrococcaceae</i> ²	13 (22,8)
Total: 444 Isolate	72 (16,2)

1: TNase-positiv, Reaktion mit *S.aureus*-TNase-Antiserum

2: außer *S.aureus*

3.2.9.5 Pigmentbildung

Die Pigmentierung wurde in golden, gelb und weiß unterteilt. Die Pigmentverteilung ist Tab. 19 zu entnehmen.

Tabelle 19: Pigmentierung auf Rinderblutagar

	Pigmentierung		
	golden (%)	gelb (%)	weiß (%)
<i>S.aureus</i> ¹ (n=387)	60 (15,5)	201 (51,9)	126 (32,6)
<i>Micrococcaceae</i> ² (n=57)	0	10 (17,5)	47 (82,5)

1: TNase-positiv, Reaktion mit *S.aureus*-Antiserum

2: außer *S.aureus*

4. Besprechung der Ergebnisse und Diskussion

Sowohl in der bakteriologischen Routineuntersuchung von Lebensmitteln (ISO, 1983), als auch bei der Mastitisdiagnostik (DVG, 1980) rechtfertigt im allgemeinen ein positives Ergebnis im Koagulasetest die Diagnose *S.aureus*. Der im Röhrchen durchgeführte Koagulasetest kann allerdings im ungünstigsten Fall 48 h dauern. Der als Alternative hierzu empfohlene Klumpungstest (BIRCH-HIRSCHFELD, 1934; CADNESS-GRAVES et al., 1943) liefert dagegen das Ergebnis innerhalb weniger Sekunden. Voraussetzung für die Anwendung dieses Schnelltests ist das regelmäßige Vorkommen des Klumpungsfaktors bei den als potentielle Erreger von Lebensmittelintoxikationen oder Euterentzündungen in Frage kommenden koagulasepositiven Staphylokokken. Von *S.intermedius* (HAJEK, 1976) und *S.hyicus* subsp. *hyicus* (DEVRIESE et al., 1978) ist bekannt, daß nur bei 14 bzw. 0 % der Stämme mit einem positiven Ergebnis im Klumpungstest zu rechnen ist. Allerdings ist zur Zeit noch nicht abzuschätzen, ob und inwieweit diese beiden Spezies als Erreger von Lebensmittelintoxikationen oder Mastitiden eine Rolle spielen (siehe 2.1). *S.aureus* galt bisher aufgrund zahlreicher Untersuchungen an humanen Stämmen als zu einem hohen Prozentsatz klumpungsfaktorpositiv (siehe 2.5), wenn auch eine Reihe von Arbeiten vorliegen, die von weniger als 95 bis etwa 70 % Übereinstimmung zwischen dem Vorkommen von Koagulase und Klumpungsfaktor berichten (WILLIAMS und HARPER, 1946; KLEMPERER und HAUGHTON, 1957; JELJASZEWICZ, 1958; MORTON und COHN, 1972; MYRICK und ELLNER, 1982). Die Ergebnisse älterer Untersuchungen an *S.aureus*-Stämmen des Rindes ließen vermuten, daß auch hier ein relativ hohes Maß an Übereinstimmung zwischen den beiden Prinzipien besteht. Der Anteil der klumpungsfaktorpositiven Isolate wird mit 93 (POUTREL und DUCCELLIEZ, 1979) bis 100 % (BRÜCKLER et al., 1974) angegeben. 1984 veröffent-

lichten BOUWMAN und VINCENTIE sowie JASPER et al. ihre Untersuchungen an *S. aureus*-Stämmen aus Rohmilch, bei denen nur in 79 (BOUWMAN und VINCENTIE, 1984) bzw. 49,2 % (JASPER et al., 1984) der Fälle der Klumpungsfaktor nachgewiesen werden konnte. Die Ergebnisse weiterer Untersuchungen von NOWAKOWSKI et al. (1985), RÖDER (1985) und BECKER et al. (1987) schwanken zwischen 82 und 84,3 % klumpungsfaktorpositiver Kulturen (siehe 2.5, Tab. 8).

Die von RÖDER (1985) und BECKER et al. (1987) geprüften Isolate wurden aus Viertelgemelksproben von Betrieben, die im Einzugsgebiet des Tiergesundheitsdienstes Bayern, Grub liegen, gewonnen. Wahrscheinlich sind die Ergebnisse beider Autoren hinsichtlich des Klumpungsfaktors deshalb auch nahezu identisch. Es erschien interessant zu prüfen, ob sich die Beobachtungen von RÖDER (1985) und BECKER et al. (1987) auch in anderen Regionen bestätigen lassen. Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es daher, im Einzugsgebiet des Tiergesundheitsdienstes Bayern, Region Schwaben-Süd (Allgäu) *S. aureus*-Stämme aus Viertelgemelksproben zu sammeln und auf die Bildung von Koagulase und Klumpungsfaktor zu untersuchen. Außerdem sollten an den Isolaten Erhebungen zum Vorkommen einiger weiterer Parameter durchgeführt werden, denen unter mikrobiologisch-diagnostischen (Pigmentierung der Kolonien, Hämolyse, Eigelbfaktor, Thermonuklease), therapeutischen (Penicillinasebildung) und toxinologischen (Enterotoxinbildung) Aspekten Bedeutung beigemessen wird.

Zunächst wurden aus Viertelgemelksproben über Rinderblutagar 444 grampositive, katalasepositive Kokken isoliert. Eine weitere Unterteilung in *S. aureus* und "sonstige Micrococcaceae" erfolgte anhand des serologischen Nachweises einer für *S. aureus* spezifischen Thermonuklease (TNase). Die Fähigkeit zur TNase-Bildung gilt als ein sehr stabiles Merkmal von *S. aureus*. Nach BARRY et al. (1973), BAIRD-PARKER (1974), RAYMAN et al. (1975),

SPERBER und TATINI (1975), TATINI et al. (1976), SPERBER (1977), PARK et al. (1980) und SANKARAN und LEELA (1982) konnte bei mehr 99 % aller geprüften Stämme das Enzym nachgewiesen werden. Auch bei Isolaten aus Milch und Milchprodukten (JASPER, 1973; MAHMOUD et al., 1980; HILL, 1983b; JASPER et al., 1985) war eine gute Übereinstimmung zwischen Koagulase- und TNase-Bildungsvermögen festzustellen. Aus zahlreichen Untersuchungen geht hervor, daß *S.aureus*-TNase mit Hilfe eines spezifischen Antiserums von den übrigen TNase bildenden Bakterien, darunter auch den wie *S.aureus* koagulasepositiven Spezies *S.intermedius* (LACHICA et al., 1979, GUDDING, 1983; GUDDING und NESS, 1985), *S.hyicus* subsp. *hyicus* (LACHICA et al., 1979; GUDDING, 1983; BECKER et al., 1984; GUDDING und NESS, 1985; FLANDROIS und CHOMARAT, 1985; TAKEUCHI et al., 1985) und koagulasenegative Staphylokokken (GUDDING, 1983; BECKER et al., 1984) abgegrenzt werden kann. Damit bietet sich eine einfache Differenzierung der Isolate über den serologischen Nachweis der *S.aureus*-TNase an (Seroinhibitionstest, LACHICA et al., 1979). Wie aus 3.2.5, Tab. 14, ersichtlich, zeigten in den eigenen Untersuchungen 390 der 444 grampositiven, katalasepositiven Kokken TNase-Bildungsvermögen. Drei dieser Isolate waren zwar im TNase-Test positiv, reagierten aber im Seroinhibitionstest negativ.

Da FLANDROIS und CHOMARAT (1985) im Gegensatz zu den übrigen oben genannten Autoren eine Reaktion zwischen *S.aureus*-TNase-Antiserum und *S.intermedius*-TNase beobachteten, wurden, um Verwechslungen mit *S.intermedius* auszuschließen, einige weitere, für die Abgrenzung zwischen *S.aureus* und *S.intermedius* wichtige Reaktionen (Acetoinbildung, aerober Abbau von Maltose, aerober und anaerober Abbau von Mannit; HAJEK, 1976; SCHAUPETER, 1987) durchgeführt. Nach allen bisher bekannten Untersuchungen bildet *S.intermedius* weiße Kolonien (siehe 2.1). Die weitergehenden Tests konnten daher auf derartige Isolate

beschränkt werden. Die drei oben erwähnten TNase-positiven aber im Seroinhibitionstest negativ reagierenden Kulturen wurden ebenfalls einbezogen. Von 75 zufällig aus den insgesamt 126 weißen und im Seroinhibitionstest positiv reagierenden Isolaten ausgewählte Kulturen zeigten alle in den drei biochemischen Tests die für *S.aureus* typischen Reaktionen, nämlich Acetoinbildung, Abbau von Maltose (aerob) und Abbau von Mannit (aerob und anaerob). Berücksichtigt man zusätzlich den bei allen geprüften Isolaten ebenfalls positiv ausgefallenen Koagulasetest, so konnte durch die eigenen Untersuchungen die bei den verschiedenen oben genannten Autoren beschriebene Möglichkeit der Identifizierung von *S.aureus* durch serologischen Nachweis seiner TNase bestätigt werden. Die drei TNase-positiven, im Seroinhibitionstest negativen Kulturen reagierten hinsichtlich der sonstigen geprüften Kriterien nicht wie *S.aureus* und bildeten unter anderem auch keine Koagulase (siehe 3.2.8, Tab. 15, Isolate 1-3). Aufgrund der sehr starken TNase-Reaktion könnte es sich möglicherweise um koagulasenegative Stämme von *S.hyicus* subsp. *hyicus* handeln, wofür auch die Kombination der übrigen geprüften Merkmale spricht, wenn man von dem positiven Klumpungstest bei Isolat Nr. 3 absieht (DEVRIESE und HAJEK, 1980). Diese Kulturen wurden zu den "sonstigen Micrococcaceae" gezählt.

Die wie oben beschrieben in *S.aureus* (387 Stämme) und "sonstige Micrococcaceae" (57 Kulturen) unterteilten Isolate wurden auf Koagulasebildung und Vorkommen des Klumpungsfaktors geprüft. Im Koagulasetest (Röhrchentest mit EDTA-stabilisiertem Kaninchenplasma) reagierten alle *S.aureus*-Stämme und eine Kultur der "sonstigen Micrococcaceae" positiv. Das letztgenannte Isolat (siehe 3.2.8, Tab. 15, Isolat 4) bildete keine TNase, verhielt sich aber, abgesehen vom fehlenden Klumpungsfaktor, hinsichtlich der sonstigen Kriterien wie *S.aureus*.

Möglicherweise handelt es sich bei dieser Kultur um einen der sehr selten vorkommenden TNase-negativen *S.aureus*-Stämme (HOOVER, 1983; JASPER et al., 1985; ABBAR et al., 1986). Zur besseren Übersichtlichkeit wurde diese Kultur weiterhin der Gruppe "sonstige Micrococcaceae" zugerechnet (3.2.6., Tab. 14). Bei allen 387 *S.aureus*-Stämmen war die Koagulasereaktion deutlich (kein Abfließen von Flüssigkeit nach Stürzen der Röhrchen) und in 381 Fällen bereits nach 4 h, bei den übrigen nach 24 h ablesbar. Eine nachträgliche Lysis des Koagulums, wie sie KITZROW und BLOBEL (1981) bei einem gewissen Prozentsatz der *S.aureus*-Stämme von Rindern durch Staphylokinase für möglich halten (2.4), wurde nicht beobachtet.

Von den 387 koagulasepositiven *S.aureus*-Stämmen reagierten 171 (44,2 %) im konventionellen Klumpungstest mit Kaninchenplasma positiv (3.2.6, Tab. 14). Ein ähnlich hoher Anteil klumpungsfaktornegativer Stämme von 55,8 % wurde bei Isolaten aus Milch bisher nur von JASPER et al. (1984) mit 51,8 % gefunden. In den übrigen Erhebungen lag der Anteil negativer Kulturen zwischen 0 und 21 % (2.5, Tab. 8). Vergleicht man alle in der Tabelle zusammengestellten Ergebnisse einschließlich der Resultate der eigenen Untersuchungen, so bewegten sich die Prozentzahlen an klumpungsfaktornegativen Stämmen in verschiedenen Ländern bzw. Regionen zwischen 0 und 55,8 %, während die Untersuchungen unterschiedlicher Autoren an Material aus der gleichen Region bei einem zeitlichen Abstand von zwei Jahren nahezu identische Ergebnisse erbrachten (RÖDER, 1985; BECKER et al., 1987). Dies legt den Verdacht nahe, daß hinsichtlich des Vorkommens klumpungsfaktornegativer *S.aureus*-Stämme beim Rind beträchtliche regionale Unterschiede bestehen. Weitere Untersuchungen zu dieser Problematik sind wünschenswert.

Eine mögliche Erklärung für eine negative Reaktion im Klumpungstest stellt die Kapselbildung dar (KOENIG, 1962). Obwohl ein höherer Anteil bekapselter *S.aureus*-

Stämme bei Rindern wenig wahrscheinlich ist (OPDEBEECK et al., 1987), wurden 50 zufällig ausgewählte Klumpungsfaktornegative und, zum Vergleich, auch 50 klumpungsfaktorpositive Stämme auf das Vorhandensein von Kapseln geprüft. Alle 100 Kulturen erwiesen sich als unbekapselt und verhielten sich somit wie die von BECKER et al. (1987) gefundenen klumpungsfaktornegativen Isolate.

Im Schrifttum finden sich Hinweise darauf, daß ein höherer Prozentsatz von *S.aureus*-Stämmen des Rindes in Rinderplasma besser als in Kaninchenplasma verklumpt (BRÜCKLER et al., 1981b). In den eigenen Untersuchungen wurde an 50 willkürlich ausgesuchten, im Klumpungstest mit Kaninchenplasma negativen oder positiven Isolaten der Test mit Rinderplasma durchgeführt. Keines der mit Kaninchenplasma klumpungsfaktornegativen Isolate reagierte mit Rinderplasma positiv. Dagegen zeigten zwei der Isolate, die in Kaninchenplasma verklumpten, in Rinderplasma keine Reaktion. Dieses Ergebnis spricht für die bereits von DUTHIE (1955) geäußerte Vermutung, daß Plasma des Rindes nur bedingt für den Nachweis des Klumpungsfaktors geeignet ist.

Seit einiger Zeit werden im Handel Testsysteme auf der Grundlage der Latex- oder Hämagglutination zum Nachweis des Klumpungsfaktors angeboten. Als vorteilhaft wird deren leichtere Auswertbarkeit angesehen (BECKER et al., 1987). In den eigenen Untersuchungen wurde daher der Klumpungstest parallel zur Plasmaagglutination mit einem indirekten Hämagglutinationstest (Staphyslide) durchgeführt. Alle im konventionellen Klumpungstest positiven Isolate reagierten auch im Staphyslide-Test positiv. Zwei den Ergebnissen des konventionellen Tests zufolge negative Isolate zeigten im Hämagglutinationstest das Vorhandensein des Klumpungsfaktors an. In den Untersuchungen von BECKER et al. (1987) reagierten ebenfalls zwei im konventionellen Klumpungstest negative Isolate im Staphyslide-Test positiv. Dies deutet neben der auch in

den eigenen Untersuchungen beobachteten besseren Ablesbarkeit des Hämagglutinationstests zusätzlich auf eine größere Empfindlichkeit dieses Verfahrens hin.

Tabelle 20: Vorkommen einiger wesentlicher Eigenschaften bei koagulasepositiven, klumpungsfaktorpositiven und -negativen S.aureus-Stämmen aus Rohmilch

S.aureus								
n= 387								
	koagulasepositive klumpungsfaktor- positive Stämme n=171 (%)				koagulasepositive klumpungsfaktor- negative Stämme n=216 (%)			
Hämolyse	9	13	140	9	0	8	206	2
$\alpha, \beta, \alpha\beta, -*$	(5,3)	(7,6)	(81,8)	(5,3)	(0)	(3,7)	(95,4)	(0,9)
Penicillini- nase- positiv		63	(36,8)			3	(1,4)	
Pigment	30	70	71		30	131	55	
gold, gelb, weiß	(17,6)	(40,9)	(41,5)		(13,9)	(60,6)	(25,5)	
Eigelb- faktor- positiv		58	(34,0)			1	(0,5)	

* : keine sichtbare Hämolyse

Es stellt sich die Frage, welche Bedeutung Klumpungs-faktor-negative *S.aureus*-Stämme für die Entstehung und Therapie von Euterentzündungen bzw. für die Entstehung von Lebensmittelintoxikationen haben können. Nach LÖKEN und HOYT (1962), NAIDU und NEWBOLD (1975) und RÖDER (1985) besteht eine enge Beziehung zwischen β -Hämolysin bildenden *S.aureus*-Stämmen und dem Anstieg im Zellgehalt des betroffenen Euterviertels. In den Untersuchungen von RÖDER (1985) wiesen β -Hämolysin-Bildner die höchste Euterpathogenität auf, gefolgt von β -Hämolysin-negativen aber klumpungsfaktorpositiven und β -Hämolysin-negativen und klumpungsfaktornegativen Isolaten. Vergleicht man dies mit den Resultaten der eigenen Untersuchungen (4., Tab. 20), so lassen sich 89,4 % der klumpungsfaktorpositiven und 99,1 % der klumpungsfaktornegativen *S.aureus*-Stämme aufgrund der β -Hämolysinbildung als stark euterpathogen einstufen. Werden klumpungsfaktorpositive und -negative, β -Hämolysin bildende *S.aureus* zusammengefaßt (3.2.9.1, Tab. 16), so ergibt sich ein Wert von 94,8 %. Dieser deckt sich mit vielen der im Schrifttum genannten Zahlen (2.7, Tab. 9), doch werden in einigen Arbeiten auch zum Teil wesentlich geringere Prozentsätze genannt (ELEK und LEVY, 1950; REID und WILSON, 1959; BRÜCKLER et al., 1981a; BECKER et al., 1987). Der Anteil von β -Hämolysinbildnern unter den klumpungsfaktor-negativen *S.aureus* (99,1 %) entspricht nahezu dem von BECKER et al. (1987) ebenfalls bei klumpungsfaktor-negativen Stämmen von Rindern gefundenen Wert (100 %), weicht jedoch erheblich von den Ergebnissen RÖDER's (1985) ab, der unter seinen Isolaten 17 % klumpungs-faktor-negative und gleichzeitig β -Hämolysin-negative Isolate registrierte.

Von den 57 "sonstigen Micrococcaceae" wies nur eine Kultur β -Hämolysin auf. Allerdings handelt es sich dabei um eines der unter 3.2.8, Tab. 15 zusammengefaßten atypischen Isolate (Nr. 4), die oben bereits besprochen

wurden. Das Fehlen oder zumindest seltene Vorkommen von β -Hämolyysin bei nicht der Spezies *S.aureus* zugehörigen Micrococcaceae kann auch aus den Beobachtungen von GEDEK (1966), NOWAKOWSKI et al. (1985) und BECKER et al. (1987) abgeleitet werden.

Unter dem Aspekt einer gezielten Therapie von Staphylokokkenmastitiden ist es wesentlich zu wissen, ob ein Erreger Penicillinase bildet (2.2). Bei 66 der 387 *S.aureus*-Stämme (17 %) und bei 2 der "sonstigen Micrococcaceae" (3,5 %) ließ sich Penicillinase nachweisen (3.2.9.2, Tab. 17). Verglichen mit den im Schrifttum gefundenen Anteilen an Penicillinasebildnern erscheint der Wert für *S.aureus* relativ niedrig, wenn auch in Einzelfällen noch geringere Prozentsätze genannt werden (2.2, Tab. 6). Allerdings lassen sich deutliche regionale Unterschiede hinsichtlich des Auftretens penicillinasebildender Staphylokokken registrieren. So fanden in der BRD FRESE et al. (1972) 28,5 % (Raum Gießen), LUPKE (1982) 37,5 % (Schleswig-Holstein), SABOLIC et al. (1980) 45,4 % (Raum Aulendorf) und GEDEK und KLEINSCHROTH (1979) 27,7 % (Oberbayern) bzw. 45 % (Allgäu) penicillinasepositive Staphylokokken.

Die in den eigenen Untersuchungen geprüften Isolate stammten aus dem Allgäu, wo bereits durch GEDEK (1978) und GEDEK und KLEINSCHROTH (1979) Resultate früherer Jahre vorliegen. Demnach konnten 29,4 % (1 Stamm/Herde) bzw. 45 % (mehrere Stämme/Herde) penicillinasebildende *S.aureus*-Stämme aus Viertelgemelksproben isoliert werden. Ein Vergleich mit den eigenen Ergebnissen (17 %) läßt eine rückläufige Tendenz in der Resistenzentwicklung vermuten. SCHAEREN et al. (1986) machten bei einer Analyse der Resistenzsituation in der Schweiz eine ähnliche Beobachtung: Während der Anteil penicillinasebildender *S.aureus*-Stämme 1980 noch bei 47,8 % lag, waren es 1986 nur noch 33,3 %.

Der Anteil enterotoxinogener Stämme ist bei *S.aureus* aus Viertelgemelks- oder Milchproben im allgemeinen gering (2.3, Tab. 7). In den eigenen Untersuchungen an 100 (50 klumpungsfaktorpositive und 50 klumpungsfaktornegative) zufällig aus den insgesamt 387 *S.aureus*-Kulturen ausgewählten Stämmen erwiesen sich fünf (zwei klumpungsfaktornegative, drei klumpungsfaktorpositive) als Enterotoxinbildner. Während die beiden klumpungsfaktornegativen Isolate Enterotoxin C produzierten, wurden bei den klumpungsfaktorpositiven einmal Enterotoxin A und zweimal Enterotoxin D nachgewiesen. Ein Prozentsatz von nur 5 % enterotoxinbildenden *S.aureus*-Stämmen liegt im unteren Bereich der aus dem Schrifttum bekannten Untersuchungsergebnisse (2.3, Tab. 7). Obwohl zwischen den klumpungsfaktorpositiven und -negativen Isolaten Unterschiede hinsichtlich der nachgewiesenen Enterotoxintypen bestanden, soll diese Beobachtung wegen der nur geringen Zahl an Enterotoxinbildnern nicht weiter bewertet werden.

Es ist seit langem bekannt, daß den Parametern Pigmentbildung und Eigelbfaktor (2.8, 2.9) in bakteriologisch-diagnostischer Hinsicht nur eine untergeordnete Bedeutung zukommt. Trotzdem werden sie in der Routineuntersuchung von Lebensmitteln (Eigelbfaktor) und Mastitissekreten (Pigmentierung) immer noch über Gebühr berücksichtigt. Beide Kriterien wurden daher in die vorliegenden Untersuchungen einbezogen.

Wie aus 3.2.9.4, Tab. 18 ersichtlich, zeigten von den 444 Isolaten 72 (16,2 %) eine Eigelbreaktion. Der Anteil eigelbpositiver *S.aureus*-Stämme lag bei 15,2 %, der der "sonstigen Micrococcaceae" bei 22,8 %. In der Literatur sind sehr unterschiedliche Angaben zum Vorkommen des Eigelbfaktors zu finden. Während REID und WILSON (1959), ABO-ELNAGA und KANDLER (1965) und HAJEK und MARSALEK (1969) einen relativ hohen Prozentsatz eigelbpositiver

Staphylokokken aus Mastitissekret oder Milchproben isolieren konnten, deuten andere Untersuchungen (2.8, Tab. 10) darauf hin, daß ihr Vorkommen sehr variieren kann. Der in der vorliegenden Arbeit ermittelte prozentuale Anteil eigelbpositiver "sonstiger Micrococcaceae" ist, verglichen mit dem von BECKER et al. (1987) für Isolate von Rindern ermittelten Wert von 10,7 %, als relativ hoch anzusehen. Andererseits kommt SPERBER (1977) in einer Zusammenstellung von Literaturangaben zum Vorkommen des Eigelbfaktors bei koagulasenegativen Staphylokokken unterschiedlicher Standorte ebenfalls zu einem Anteil von 23 % positiven Kulturen. Insgesamt gesehen bestätigen die vorliegenden Ergebnisse die bereits von zahlreichen anderen Autoren beschriebene Beobachtung, daß der Eigelbfaktor weder ein stabiles Merkmal von *S.aureus* darstellt, noch innerhalb der Micrococcaceae auf diese Spezies beschränkt ist.

Goldenes Pigment galt lange als typisch für Kolonien von *S.aureus* (2.8). In den eigenen Untersuchungen konnte nur bei 15,5 % der 387 *S.aureus*-Kulturen eine derartige Färbung nachgewiesen werden. Mehr als die Hälfte der Isolate (51,9 %) wies eine gelbe Pigmentierung auf (3.2.9.5, Tab. 19). Bei den "sonstigen Micrococcaceae" trat goldenes Pigment nicht auf, 82,5 % der Isolate bildeten weiße Kolonien. Ein Vergleich dieser Werte mit Angaben aus dem Schrifttum ist nur begrenzt möglich, da von den entsprechenden Autoren zum Nachweis der Pigmentierung bei Isolaten aus Mastitissekret verschiedene Nährböden herangezogen wurden (2.8, Tab. 10). Da nach O'CONNOR et al. (1966) das Medium die Farbstoffbildung beeinflussen kann, soll von den in der Tabelle aufgeführten Untersuchungen nur die von BECKER et al. (1987), die ebenfalls Rinderblutagar verwendeten, vergleichend herangezogen werden. Die Ergebnisse dieser Autoren unterscheiden sich von den eigenen Resultaten durch einen

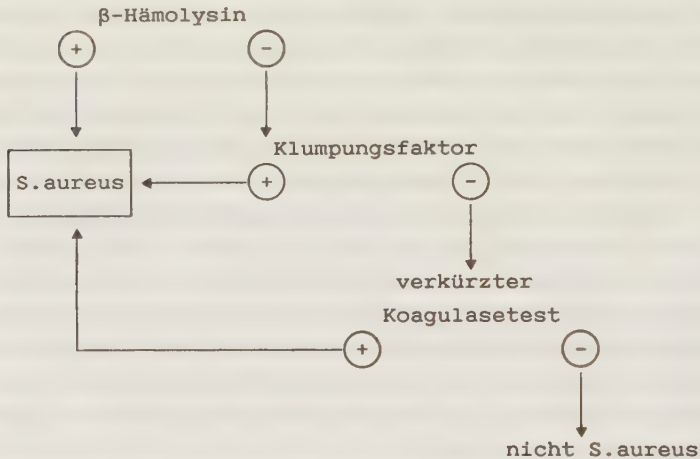
wesentlich höheren Prozentsatz golden pigmentierter Isolate (27,3 %) und einen wesentlich geringeren an solchen mit gelbem Farbstoff (36,6 %). Von den "sonstigen Micrococcaceae" wiesen sechs Kulturen goldenes Pigment auf, dessen Vorkommen sich in den eigenen Untersuchungen auf *S.aureus*-Stämme beschränkte. Die meisten "sonstigen Micrococcaceae" bildeten in beiden Erhebungen weiße Kolonien. Diese anscheinend regionalen Unterschiede in der Pigmentierung bestätigen wiederum die Erfahrung, daß die Farbe der Kolonien allein nichts über eine Zugehörigkeit zu der hinsichtlich ihrer Euterpathogenität wichtigsten Micrococcaceaespezies *S.aureus* aussagt.

Sowohl für die bakteriologische Routinediagnostik der Euterentzündungen als auch für die bakteriologische Untersuchung von Lebensmitteln ergeben sich aus den vorliegenden Ergebnissen einige Konsequenzen. Bei bakteriologischen Untersuchungen im Zusammenhang mit *S.aureus*-Mastitiden stehen im allgemeinen als diagnostische Hilfsmittel nur die Parameter Koloniemorphologie (wobei die Farbe, wie oben gezeigt, nur von untergeordneter Bedeutung ist), Hämolyse und Klumpungstest zur Verfügung. Der Klumpungstest ist zwar sehr einfach und rasch durchzuführen, doch mehrten sich durch etliche vorausgehende und die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen Zweifel daran, daß tatsächlich mit diesem Verfahren ein ausreichend hoher Prozentsatz von *S.aureus* in Viertelgemelksproben erfaßt wird. Die seit 1984 in diesem Zusammenhang durchgeführten Erhebungen lassen vermuten, daß etwa 30 % der Isolate aus Rohmilch und Mastitissekreten negativ im Klumpungstest reagieren (2.5, Tab. 8 und Ergebnisse der vorliegenden Arbeit). Den Resultaten der eigenen Untersuchungen folgend, scheint demgegenüber die Bildung von β -Hämolysin ein wesentlich stabileres Merkmal zu sein (94,8 % positiv). Wie bereits oben erwähnt, hatten allerdings einige andere Autoren

(2.7, Tab. 9) geringere Zahlen an β -Hämolysinbildnern unter den aus Rohmilch oder Mastitissekret isolierten *S.aureus*-Stämmen gefunden (zwischen 49,9 und 86 %). Unter dem Aspekt der Euterpathogenität sollten β -Hämolysin-negative Isolate nicht unberücksichtigt bleiben. So geht zwar aus der Arbeit von RÖDER (1985) hervor, daß Euter-viertel in deren Sekret β -Hämolysin-positive Kulturen nachgewiesen wurden, sehr häufig einen erhöhten Gehalt an somatischen Zellen aufwiesen (89 % der Viertel hatten einen Zellgehalt/ml von über 500 000, 55 % einen solchen über 1 Million), doch lagen die Zellgehalte von Vierteln mit β -Hämolysin-negativen Kulturen immerhin noch in 75 - 70 % über 500 000/ml und in 33 - 18 % über 1 Million/ml. Wird daher β -Hämolysin als alleiniges bakteriologisch-diagnostisches Kriterium bei der Untersuchung von Viertelgemelksproben herangezogen, so ist damit zu rechnen, daß, ähnlich wie beim Klumpungstest, ein gewisser Prozentsatz potentiell euterpathogener *S.aureus* nicht erfaßt wird.

Vergleicht man die Ergebnisse der Arbeiten von RÖDER (1985), BECKER et al. (1987) und die der eigenen Untersuchungen, so konnten BECKER et al. (1987) 75,3 % aller *S.aureus*-Stämme mittels der β -Hämolysinbildung erkennen (alle klumpungsfaktornegativen *S.aureus*-Kulturen bildeten β -Hämolysin), während die restlichen 24,7 % durch einen positiven Klumpungstest zu identifizieren waren. In den eigenen Untersuchungen wurden nur 0,5 % aller *S.aureus*-Stämme nicht mit den beiden oben genannten Kriterien erfaßt (zwei der klumpungsfaktornegativen *S.aureus* bildeten kein β -Hämolysin; 4., Tab. 20). In beiden Untersuchungen wären demnach bei gleichzeitiger Berücksichtigung der Merkmale β -Hämolysin und Klumpungsfaktor alle bzw. nahezu alle potentiell euterpathogenen *S.aureus*-Stämme identifiziert worden. Im Gegensatz hierzu wies RÖDER (1985) 17 % β -Hämolysin-negative und gleichzeitig klumpungsfaktornegative *S.aureus*-Kulturen nach.

Abbildung 1: Identifizierungsschema für als *S.aureus* verdächtige Kolonien aus Rohmilch oder Viertelgemelksproben



Diese Stämme wären bei alleiniger Anwendung der beiden Parameter nicht erfaßt worden. In den vorliegenden Untersuchungen wurde daher geprüft, inwieweit eine vereinfachte Durchführung des Koagulasetests als Ergänzung bzw. Alternative zu den oben genannten Kriterien (Koloniemorphologie, β-Hämolysin, Klumpungsfaktor) herangezogen werden kann. Zu diesem Zweck wurde Koloniematerial von Blutagar, ohne die übliche 24stündige Anreicherung über eine Bouillon, in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert, Plasma zugegeben und bebrütet (3.1.5.2). Bei den als *S.aureus* identifizierten Kulturen war eine gute Übereinstimmung zwischen diesem Verfahren und dem konventionellen Koagulasetest gegeben. Lediglich zwei der Stämme, beide klumpungsfaktorpositiv, reagierten nur im

konventionellen Verfahren. Bei ca. 75 % der Isolate ließ sich die Reaktion nach 6 h Inkubation ablesen. Die übrigen Kulturen waren nach spätestens 24 h positiv.

Unter Berücksichtigung dieser und der bisher vorliegenden Arbeiten, die sich mit klumpungsfaktornegativen *S.aureus* und ihren Merkmalen befassen (RÖDER, 1985; BECKER et al., 1987; eigene Untersuchungen) wird folgendes vorläufige Schema zur Identifizierung als *S.aureus* verdächtiger Isolate vorgeschlagen (Abb. 1).

Bei der Untersuchung von Lebensmitteln wird zur Zeit ebenfalls der Koagulasetest als Bestätigungsreaktion für *S.aureus* bzw. koagulasepositive Staphylokokken (z.B. DIN, 1988) empfohlen. Der als Selektivnährboden in diesem Zusammenhang häufig eingesetzte Baird-Parker-Agar weist bei hoher Produktivität nur eine geringe Selektivität auf (TERPLAN et al., 1981) und nutzt daher als elektives Kriterium den Nachweis des Eigelbfaktors. Da nach den Ergebnissen der eigenen, aber auch zahlreichen anderen Untersuchungen, der Eigelbfaktor weder ein exklusives noch ein stabiles Merkmal von *S.aureus* ist, ergibt sich die Notwendigkeit, sowohl eigelbpositive als auch eigelbnegative Kolonien weiter zu prüfen. Wird hierzu bei der Untersuchung von Rohmilch auf *S.aureus* der Klumpungstest herangezogen, so treten aufgrund der Herkunft zumindest eines großen Teils der Isolate vom Rind wahrscheinlich die gleichen Probleme auf, wie bei der Untersuchung von Viertelgemelksproben. Auch hier würde sich im Fall verdächtiger Kolonien bei negativem Ergebnis im Klumpungstest der verkürzte Koagulasenachweis anbieten. Die Frage, inwieweit klumpungsfaktornegative *S.aureus* in erhitzter Konsummilch oder in Milchprodukten, die aus erhitzter Milch hergestellt wurden und in denen nicht mehr die originäre Staphylokokkenflora, sondern Rekontaminanten vorliegen, eine Rolle spielen, kann aufgrund noch fehlender Untersuchungen zur Zeit nicht beantwortet werden.

5 Zusammenfassung

1. Aus Viertelgemelksproben von 444 Betrieben (Region Schwaben Süd) wurden 444 grampositive, katalasepositive Kokken isoliert (je Betrieb 1 Isolat). Mit Hilfe eines spezifischen Antiserums gegen *Staphylococcus* (S.) *aureus*-Thermonuklease sowie einiger ergänzender biochemischer Parameter wurden diese Isolate in *S.aureus* (387 Stämme) und "sonstige Micrococcaceae" (57 Kulturen) unterteilt.

2. Alle 387 *S.aureus*-Stämme zeigten eine positive Reaktion im Koagulasetest (Röhrchentest), aber nur bei 171 (44,2 %) *S.aureus*-Stämmen konnte der Klumpungsfaktor (Objektträgeretest) nachgewiesen werden. Ein verkürzter Koagulasetest ohne vorherige Anreicherung des Koloniematerials in einem flüssigen Nährboden erbrachte annähernd gleiche Resultate wie das konventionelle Verfahren.

3. Die meisten *S.aureus*-Stämme (94,8 %) bildeten β -Hämolysin entweder allein (5,4 %) oder in Kombination mit einer vollständigen Hämolyse (" α -Hämolysin"). Zwei der klumpungsfaktornegativen *S.aureus* und alle "sonstige Micrococcaceae" wiesen kein β -Hämolysin (allein oder in Kombination) auf.

4. Die Prüfung auf Penicillinasebildungsvermögen erbrachte bei 68 (15,3 %) Isolaten, davon 66 (17,0 %) *S.aureus*-Stämmen, ein positives Ergebnis. Von den 216 klumpungsfaktornegativen *S.aureus*-Stämmen waren nur drei Penicillinasebildner.

5. Ein Enterotoxinnachweis wurde bei 100 *S.aureus*-Stämmen durchgeführt. Davon erwiesen sich 5 als Enterotoxinbildner, von denen einer Enterotoxin A, zwei Enterotoxin C und zwei Enterotoxin D bildeten.

6. Nur 16,2 % der 444 Isolate bildeten den Eigelbfaktor, wobei der Anteil eigelbpositiver *S.aureus*-Stämme mit 15,2 % niedriger lag als der der "sonstigen Micrococcaceae" (22,8 %). Weiße Kolonien traten bei 32,6 % der *S.aureus*-Stämme und bei 82,5 % der "sonstigen Micrococcaceae" auf.

7. Für die Routineuntersuchung von Viertelgemelksproben auf *S.aureus* wird bei der Bestätigung verdächtiger Isolate ein Identifizierungsschema bestehend aus den Parametern β -Hämolysin-Bildung, Klumpungs- und verkürzter Koagulasetest vorgeschlagen.

Summary

Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk with special reference to the clumping factor

1. 444 gram positive, catalase positive cocci were isolated from quarter-milk samples of 444 farms in a southwestern area of Bavaria (1 isolate 1 farm). Using a specific antiserum against *Staphylococcus (S.) aureus* thermonuclease and some additional biochemical tests the cocci could be classified in *S. aureus* (387 strains) and "other micrococcaceae" (57 cultures).

2. All of the 387 *S. aureus* strains showed a positive reaction in the tube coagulase test. The clumping factor (slide test) could only be detected in 171 (44,2 %) *S. aureus* strains. Using a tube coagulase test without previous subculturing of the colonies in a liquid medium similar results as in the conventional coagulase test could be observed.

3. Most of the *S. aureus* strains (94,8 %) produced β -haemolysin, either alone (5,4 %) or combined with " α -haemolysin". Only two of the clumping factor negative *S. aureus* strains and all of the "other micrococcaceae" failed to show β -haemolytic activity.

4. Penicillinase was produced by 68 (15,3 %) of the isolates. 66 (17,0 %) of this cultures belonged to *S. aureus* including three out of the 216 clumping factor negative strains.

5. 5 of 100 *S. aureus* strains were enterotoxin producers. One strain produced type A, two produced type C and two produced type D.

6. Only 16,2 % of the 444 isolates showed the egg yolk reaction. A higher percentage of "other micrococcaceae" (22,8 %) compared with strains of *S.aureus* (15,2 %) was egg yolk positive.

7. An identification scheme for confirmation of suspect colonies including the parameters β -haemolysin production, clumping factor and coagulase test (without subculturing in liquid medium) is recommended for routine examination of quarter-milk samples.

6. Literaturverzeichnis

ABBAR, F.M., W. TAHIR MOHAMMED und S.H. ARSLAN (1986):
Selected biological properties of enterotoxigenic
staphylococci isolated from milk.
J. Food Prot. 49, 871 - 873

ABO-ELNAGA, I.G. und O. KANDLER (1965):
Zur Charakterisierung der in Milch verbreiteten
Staphylokokken.
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 196, 438 -451

ABRAHAM, E.P. und E. CHAIN (1940):
An enzyme from bacteria able to destroy penicillin.
Nature 146, 837

ADAM, D. und W. CHRIST (1987):
Antibiotika und Chemotherapeutika,
Antiinfektiöse Therapie
in: FORTH, W. (Hrsg) , D. HENSCHLER und W. RUMMEL
Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie,
p.598
Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien, Zürich

ALDRIDGE, K.E., C. KOGOS, C.V. SANDERS und R.L. MARIER
(1984):
Comparison of rapid identification assays for S. aureus.
J. Clin. Microbiol 19, 703 - 704

ALMAZAN, J., DE LA FUENTE, E. GOMEZ-LUCIA und G. SUAREZ
(1987):
Enterotoxin production by strains of Staphylococcus
intermedius and Staphylococcus aureus isolated from dog
infections.
Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 264, 29 - 32

AMTSBERG, G. (1979):

Vergleichende biochemische und serologische Untersuchungen an Staphylokokken von Schweinen und Rindern unter besonderer Berücksichtigung von *Staphylococcus hyicus* bzw. *Staphylococcus epidermidis* Biotyp 2.

Zbl. Vet. Med. B 26, 137 - 152

ANDREWS, R.J., B. KITCHEN, W.S. KWEE und F. DUNCALFE (1983):

Relationship between individual cow somatic cell counts and the mastitis infection status of the udder.

Aust. J. Dairy Technol. 38, 71 - 74

BAIRD-PARKER, A.C. (1961):

An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive staphylococci.

J. appl. Bact. 25, 12 - 19

BAIRD-PARKER, A.C. (1974):

Staphylococcus

in: BUCHANAN, R.E. und N.E. GIBBONS (eds),

BERGEY's Manual of determinative bacteriology 8th ed.,

483 - 489

The Williams & Wilkins Company, Baltimore

BAKER, J.S., M.A. BORMANN und D.H. BOUDREAU (1985):

Evaluation of various rapid agglutination methods for the identification of *S. aureus*.

J. Clin. Microbiol. 21, 726 - 729

BARRY, A.L., R.V.F. LACHICA und F.W. ATCHINSON (1973):

Identification of *S. aureus* by simultaneous use of tube coagulase and thermonuclease tests.

Appl. Microbiol. 25, 496 - 497

BATISH, V.K., H. CHANDER und B. RANGANATHAN (1982):
 Characterization of desoxyribonuclease-positive enterococci isolated from milk and milkproducts.
 J. Food Prot. 45, 348 - 352

BECKER, G. (1984):
 Zur Optimierung des Thermonuklease-Nachweises in
 Lebensmitteln.
 Diss. med. vet. München

BECKER, H., T.A. EL - BASSIONY und G. TERPLAN (1984):
 Zur Abgrenzung der Staphylococcus aureus-Thermonuclease
 von hitzestabilen Nucleasen anderer Bakterien.
 Arch. Lebensmittelhyg. 35, 114 - 118

BECKER, H., K. ZAADHOF und G. TERPLAN (1987):
 Zur Charakterisierung von Staphylococcus aureus-Stämmen
 des Rindes unter besonderer Berücksichtigung des
 Klumpungsfaktors.
 Arch. Lebensmittelhyg. 38, 12 - 19

BERGDOLL, M.S. (1972):
 The enterotoxins.
 in: COHEN, J.O.: The staphylococci, 301 - 331
 Wiley - Interscience, New York, London, Sydney, Toronto

Derselbe (1979):
 Staphylococcal intoxications.
 in: RIEMANN, H. und F.L. BRYAN: Food-borne infections and
 intoxications, 2. Aufl., p. 443 - 494
 Academic Press, New York, San Francisco und London

Derselbe (1983):

Enterotoxins.

in: EASMON, C.S.F. und G. ADLAM: Staphylococci and staphylococcal infections, Bd. II (The organism in vitro and in vivo), p. 559 - 598

Academic Press Inc., London

Derselbe (1985):

The staphylococcal enterotoxins - an update.

in: JELJASZEWICZ, J. (Hrsg.): The staphylococci, Zbl. Bakt. Suppl. 14, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart - New York

BERGDOLL, M.S. und R.N. ROBBINS (1973):

Characterization of types of staphylococcal enterotoxins. J. Milk Food Technol. 36, 610 - 612

BERGDOLL, M.S., C.R. BORJA und R.M. AVENA (1965):

Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C. J. Bacteriol. 90, 1481 - 1485

BERGER, F.M., (1943):

Clumping of pathogenic staphylococci in plasma. J. Path. Bact. 55, 435 - 440

BERGEY'S Manual of Systematic Bacteriology (1986):

SNEATH, P.H.A., N.S. MAIR, M.E. SHARPE und J.G. HOLT, first edition, Bd. II.

The Williams & Wilkins Company, Baltimore

BERNHEIMER, A.W. (1968):

Cytolytic toxins of bacterial origin. Science 159, 847 - 851

BIBERSTEIN, E.L., S.S. JANG und D.C. HIRSCH (1984):
Species distribution of coagulase-positive staphylococci
in animals.

J. Clin. Microbiol. 19, 610 - 615

BIRCH - HIRSCHFELD, L., (1934):

Über die Agglutination von Staphylokokken durch Bestand-
teile des Säugetierblutplasmas.

Klin. Wschr. 13, 331 - 333

BISSONNETTE, N., R. A. LACHANGE, J. GOULET, M. LANDGRAF
und C.E. PARK (1980):

Evidence of thermonuclease production by *Bacillus* spp.
and enterococci in naturally contaminated cheese.

Can. J. Microbiol. 26, 722 - 725

BLOBEL, H. und J. BRÜCKLER (1980):

Staphylokokken.

in: BLOBEL, H. und T. SCHLIESSER (Hrsg): Handbuch der
bakteriellen Infektionen bei Tieren, Bd. II, p. 1 - 129

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York

BONIECE, W.S., W.E. WICK und D.H. HOLMES (1957):

White variants derived from *Staphylococcus aureus*:
comparisons with parent strains.

J. Bacteriol. 73, 685 - 686

BOUWMAN, R. und H. VINCENTIE (1984):

An evaluation of the Staphyslide test for the identi-
fication of *Staphylococcus aureus*.

Antonie van Leeuwenhoek, 50, 195

BRANDISH, J. M. und A. T. WILLIS (1970):

Observations on the coagulase and desoxyribonuclease
tests for staphylococci.

J. Med. Lab. Technol. 27, 355 - 358

BROWN, W.J. (1986):

Comparison of a yellow latex reagent with other agglutination methods for the identification of *Staphylococcus aureus*.

J. Clin. Microbiol. 23, 640 - 642

BRÜCKLER, J., W. SCHAEGER und H. BLOBEL (1974):

Untersuchungen am "Clumping Factor" von Staphylokokken.

Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A. 227, 228 - 230

BRÜCKLER, J., H. KLIMA, W. SCHAEGER, D. MANZ und H. BLOBEL (1981a):

Staphylococcus aureus von Kühen mit subklinischen Euterinfektionen.

Zbl. Vet. Med. B 28, 494 - 499

BRÜCKLER, J., U. BERLICH, W. SCHAEGER und H. BLOBEL (1981b):

Clumping factor Reaktionen von *S. aureus* verschiedener Herkunft in Plasma- und Fibrinogenpräparationen.

Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 251, 27 - 32

BURNET, F.M. (1930):

The production of staphylococcal toxin.

J. Path. Bact. 33, 1 - 16

CADNESS - GRAVES, B., R. WILLIAMS, G.J. HARPER und A.A. MILES (1943):

Slide tests for coagulase - positive staphylococci.

Lancet (1), 736 - 738

CARRET, G., J.P. FLANDROIS, R. BISMUT und M. SAULNIER (1982):

Relative value of staphylocoagulase and fibrinogen affinity for the identification of *Staphylococcus aureus*.

J. appl. Bact. 53, 351 - 354

CASMAN, E.P., R.W. BENNET, A.E. DORSEY und J.A. ISSA (1967):

Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D.

J. Bacteriol. 94, 1875 - 1882

CRAVEN, N., J.C. ANDERSON und T.O. JONES (1986):

Antimicrobial drug susceptibility of Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis.

Vet. Rec. 118, 290 - 291

CUNNINGHAM, L., B.W. CATLIN und M. PRIVAT DE GARILHE (1956):

A desoxyribonuclease of Micrococcus pyogenes.

J. Am. Chem. Soc. 78, 4642 - 4644

DE CHRISTMAS, M.J. (1888):

Recherches experimentales sur la suppuration.

Ann. Inst. Pasteur 2, 469 - 478

zit. n. MÖLLBY, R. (1983):

Isolation and properties of membrane damaging toxins.

in: EASMON, C.S.F. und C. ADLAM: Staphylococci and staphylococcal infections, Bd. II (The organism in vitro and in vivo), p. 619 - 669

DE LA FUENTE, R., G. SUAREZ und K.H. SCHLEIFER (1985):

Staphylococcus aureus subsp. anaerobius subsp. nov., the causal agent of abscess disease of sheep.

Int. J. Syst. Bacteriol. 35, 99 - 102

DEVOYOD, J.J., L. MILLET und G. MOCQUOT (1976):

Un milieu gélosé pour le dénombrement direct de Staphylococcus aureus: milieu au plasma de porc pour S. aureus (PPSA).

Can. J. Microbiol. 22, 1603 - 1611

DEVRIESE, L.A. (1979):

Identification of clumping - factor - negative staphylococci isolated from cows' udders.

Res. Vet. Sci. 27, 313 - 320

DEVRIESE, L.A. und V. DE KEYSER (1980):

Prevalence of different species of coagulase - negative staphylococci on teats and in milk samples from dairy cows.

J. Dairy Res. 47, 155 - 158

DEVRIESE, L.A. und V. HAJEK (1980):

Identification of pathogenic staphylococci isolated from animals and foods derived from animals.

J. appl. Bact. 49, 1 - 11

DEVRIESE, L.A., V. HAJEK, P. OEDING, S.A. MEYER und K.H. SCHLEIFER (1978):

Staphylococcus hyicus (SOMPOLINSKY, 1953) comb. nov. and *Staphylococcus hyicus* subsp. *chromogenes* subsp. nov.

Int. J. Syst. Bacteriol. 28, 482 - 490

DEVRIESE, L.A., K.H. SCHLEIFER und G.O. ADEGOKE (1985):

Identification of coagulase - negative staphylococci from farm animals.

J. appl. Bact. 58, 45 - 55

DEVRIESE, L.A., B. POUTTEL, R. KILPPER - BÄLZ und K.H. SCHLEIFER (1983):

Staphylococcus gallinarum and *Staphylococcus caprae* two new *Staphylococcus* species from animals.

Int. J. Bacteriol. 33, 480 - 486

DIN (1988):

DIN 10178 Teil 3, Mikrobiologische Milchuntersuchung, Bestimmung Koagulase-positiver Staphylokokken; Koloniezählverfahren, April 1988.

DONNELLY, C.B. (1967):

Serological identification of enterotoxigenic staphylococci from cheese.

Appl. Microbiol. 15, 1382 - 1387

DUTHIE, E.S. (1954):

Evidence for two forms of staphylococcal coagulase.

J. Gen. Microbiol. 10, 427 - 436

Derselbe (1955):

The action of fibrinogen on certain pathgenic cocci.

J. Gen. Microbiol. 13, 383 - 393

DUTHIE, E.S. und L.L. Lorenz (1952):

Staphylococcal coagulase: Mode of action and antigenicity.

J. Gen. Microbiol. 6, 95 - 107

DVG (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft),
Fachgruppe Milchhygiene des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene (1980):

Die subklinische Mastitis des Rindes und Vorschläge für bundeseinheitliche Richtlinien zu ihrer Bekämpfung.

ELEK, S.D. und LEVY (1950):

Distributions of haemolysins in pathogenic and non pathogenic staphylococci.

J. Path. Bact. 62, 541 - 554

ESSERS, L. und K. RADEBOLD (1980):

Rapid and reliable identification of *S. aureus* by a latex agglutination test.

J. Clin. Microbiol. 12, 641 - 643

FLANDROIS, J.P. und G. CARRET (1981):

Untersuchung der Affinität von Staphylokokken zu Fibrinogen mittels passiver Hämagglutination als Hilfsmittel zur Identifizierung von *S. aureus*.

Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A. 251, 171 - 176

FLANDROIS J.P. und M. CHOMARAT (1985):

Charakterization of *S. aureus* nuclease by seroinhibition

in: J. JELJASZEWICZ (Hrsg.): The Staphylococci. p. 263 - 265. Zbl. Bakt. Suppl., 14. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart - New York.

FRANKLIN, A. und M.H. RANTZIEN (1983):

Antimicrobial drug susceptibility of *S. aureus* strains isolated from bovine milk.

Nord. Veterinaarmed. 35, 460 - 464

FRENEY, J., Y. BRUN, M. BES, H. MEUGNIER, F. GRIMONT, P.A.D. GRIMONT, C. NERVI und J. FLEURETTE (1988):

Staphylococcus lugdunensis sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov., two species from human clinical specimens.

Int. J. Syst. Bacteriol. 38, 168 - 172

FRESE, E., W. SCHAEGER und H. BLOBEL (1972):

Penicillinaseaktivität bei Staphylokokken beim Rind.

Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A. 220, 137 - 139

FROST, A. und D. O'BOYLE (1981):

Resistance to antimicrobial agents of *S. aureus* isolated from the bovine udder.

Aust. vet. J. 57, 262 - 267

FUKUDA, S., H. TOKUNO, H. OGAWA, M. SASAKI, T. KISHIMOTO, J. KAWANO, A. SHIMIZU, S. KIMURA (1984):

Enterotoxigenicity of *Staphylococcus intermedius* strains isolated from dogs.

Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A. 258, 360 - 367

GARCIA M.L., B. MORENO und M.S. BERGDOLL (1980):

Charakterization of staphylococci isolated from mastitic cows in Spain.

Appl. Environ. Microbiol. 39, 548- -553

GARCIA LOPEZ, M.L. und B. MORENO GARCIA (1980):

[Enzyme properties of staphylococci isolated from milk samples from mastitis cows and their relationship to coagulase and thermostable DNase production and sensitivity to lysostaphin]

Anales de la Facultad de Veterinaria de Leon 24, 183 - 193

GEDEK, W. (1966):

Zur Routinediagnostik in Milch vorkommender Staphylokokken und Mikrokokken.

Arch. Lebensmittelhyg. 17, 110 - 113

Derselbe (1972):

Die Staphylokokken - Mastitis bei Haustieren.

VEB Gustav Fischer Verlag, Jena

Derselbe (1978):

Penicillinase-Bildung und minimale Hemmkonzentration von Betalactam-Antibiotika bei euterpathogenen Staphylokokken.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 91, 367 - 369

Derselbe (1981):

Empfindlichkeitsprüfung von Mastitiserregern gegenüber Penicillinen.

2. Staphylococcus aureus

Tierärztl. Umschau 36, 767 - 770

GEDEK, W. und U. KOPP (1967):

Koagulasepositive Staphylokokken aus Kuhmilch

I. Charakteristika

Arch. Lebensmittelhyg. 18, 247 - 250

GEDEK, W und E. KLEINSCHROTH (1979):

Verbreitung penicillinasebildender Staphylokokken und Mikrokokken in Milchviehherden.

Tierärztl. Umschau 34, 474 - 476

GILLESPIE, W.A. und V.G. ALDER (1952):

Production of opacity in egg-yolk media by coagulase-positive staphylococci.

J. Path. Bact. 64, 187 - 200

GLENNY, A.T. und M.F. STEVENS (1935):

Staphylococcus toxins and antitoxins.

J. Path. Bact. 40, 201 - 210

GRAMOLI, J.L. und B.J. WILKINSON (1978):

Charakterization and identification of coagulase - negative, heatstable desoxyribonuclease positive staphylococci.

J. Gen. Microbiol. 105, 275 - 285

GREGERSEN, T. (1978):

Rapid method for distinction of gram-negative from gram-positive bacteria.

European J. Appl. Microbiol. 5, 123 - 127

GROSSGEBAUER, K., B. SCHMIDT und H. LANGMAACK (1968):

Lysozyme Production as an aid for identification of potentially pathogenic strains of staphylococci.

Appl. Microbiol. 11, 1745 - 1747

GRÜN, L. (1961):

Die biochemischen Eigenschaften der Staphylokokken im Hinblick auf Pathogenitätsbestimmung und Differenzierung der Keime zur Erkennung des Staphylokokken - Hospitalismus.

Köln und Opladen , Westdeutscher Verlag

Derselbe (1964):

Staphylokokken in Klinik und Praxis, Biologie, Epidemiologie, Therapie und Infektionen

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft MBH., Stuttgart

Derselbe (1968):

Zur Bestimmung von Standortvarianten der Staphylokokken humaner und boviner Herkunft.

Milchwissensch. 23, 604 - 608

GRUMMIT, J.K. (1969):

A plate test for staphylococcal coagulase.

J. med. Lab. Technol. 26, 227 - 230

GUDDING, R. (1979):

The demonstration and characterization of desoxyribonucleases of streptococci group A, B, C, G and L.

Acta vet. scand. 20, 102 - 121

Derselbe (1983):

Differentiation of staphylococci on the basis of nuclease properties.

J. Clin. Microbiol. 18, 1098 - 1101

GUDDING, R. und E. NESS (1985):

Differentiation of staphylococcal isolates from veterinary clinical specimens

in: J. JELASZEWICZ (Hrsg): The staphylococci, p. 341 - 342
Zbl. Bakt. Suppl. 14

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart - New York

GUYONNET, F., M. PLOMMET und C. BOUILLANNE (1968):

Purification de l'hémolysine γ de *Staphylococcus aureus*.

C. R. Acad. Sci. 267, 1180 - 1182

HAJEK, V. (1976):

Staphylococcus intermedius, a new species isolated from animals.

Int. J. Syst. Bacteriol. 26, 401 - 408

HAJEK, V. und E. MARSALEK (1969a):

A study of Staphylococci of bovine origin *S. aureus* var. *bovis*.

Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 209, 154 - 160

Dieselben (1969b):

A study of staphylococci isolated from the upper respiratory tract of different animal species.

Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 212, 60 - 73

Dieselben (1971):

The differentiation of pathogenic staphylococci and a suggestion for their taxonomic classification.

Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 217, 176 - 182

Dieselben (1976):

Evaluation of classificatory criteria for staphylococci.
in: JELJASZEWICZ, J.: Staphylococci and staphylococcal
diseases. Proc. III. Int. Symp. Staphylococci and
Staphylococcal Infect., Warszawa, Sept. 8. - 14.

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York

HAJEK, V., L.A. DEVRIESE, M. MORDARSKI, M. GOODFELLOW,
G. PULVERER und P.E. VARALDO (1986):

Elevation of *Staphylococcus hyicus* subsp. *chromogenes*
(DEVRIESE et al., 1978) to species status: *Staphylococcus*
chromogenes (DEVRIESE et al., 1978) comb. nov.

Syst. Appl. Microbiol. 8, 169 - 173

HARTUNG, S.C. (1986):

Zur Produktion und Reinigung von Staphylokokken-
Enterotoxin D.

Diss. med. vet., München

HARVEY J. und A. GILMOUR (1985):

Application of current methods for isolation and identi-
fication of staphylococci in raw bovine milk.

J. appl. Bact. 59, 207 - 221

HAUSCHILD, A.H.W., C.E. PARK und R. HILSHEIMER (1979):

A modified pork plasma agar for the enumeration of
Staphylococcus aureus in food.

Can. J. Microbiol. 25, 1052 - 1057

HEESCHEN, W., J. REICHMUTH, A. TOLLE und H. ZEIDLER
(1970)

Lysotypen, biochemische Leistungsspektren, Antibio-
gramme und Enterpathogenität koagulasepositiver boviner
Staphylokokken.

Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 213, 333 - 348

HIGHSMITH A.K. und E.B. SHOTTS (1965):

Rapid method of determining coagulase activity during staphylococcal bacteriophage typing.

Appl. Microbiol. 13, 34 - 36

HILEMAN, J.L. (1940):

Thermotolerant bacteria in pasteurized milk. a review of literature.

J. Dairy Sci. 23, 1143 - 1161

HILL, B.M. (1983a):

Enterotoxin-producing Staphylococcus aureus isolated from milk and dairy products.

N. Z. J. Dairy Sci. Tech. 18, 59 - 62

Derselbe (1983b):

The thermo-stable nuclease test as a method for identifying Staphylococcus aureus.

Aust. J. Dairy Technol. 38, 95 - 96

HIRVELÄ, V. und H. KORKEALA (1982):

The suitability of human and various animal plasmas in the tube coagulase test with enterotoxigenic S. aureus.

Arch. Lebensmittelhyg. 33, 81 -84

HOOVER, D.G., S.R. TATINI und J.B. MALTAIS (1983):

Characterization of staphylococci.

Appl. Environ. Microbiol. 46, 649 - 660

ICMSF (1978):

The International Commission on Microbiological Specifications on Foods of the International Association of Microbiological Societies: Microorganism in food 1

Their significance and methods of enumeration

University of Toronto Press, Toronto, Buffalo, London

IGARASHI, H., M. SHINGAKI, H. USHIODA, H. FUJIKAWA,
T. TERAYAMA, J. KAWANO und A. SHIMIZU (1985):

Immunological differentiation of staphylocoagulase
produced by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus*
intermedius.

in: JELJASZEWICZ, J. (Hrsg.): The staphylococci and
staphylococcal infections, Zbl. Bakt. Suppl. 14,
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York

IMSANDE, J. (1978):

Genetic regulation of penicillinase synthesis in gram -
positive bacteria.

Microbiol. Rev. 42, 67 - 83

INNES, A.G. (1960):

Tellurite-egg agar, a selective and differential medium
for the isolation of coagulase positive staphylococci.

J. appl. Bact. 23, 108 - 113

ISO (1983):

International Standard 6888: Microbiology - General
guidance for enumeration of *Staphylococcus aureus* -
Colony count technique, Ref. Nr. ISO 6888-1983 (E),
International Organization for Standardization

JASPER, D.E. (1973):

Thermostable nuclease production by staphylococci in milk
samples from bovine mastitis.

Am. J. Vet. Res. 34, 445 - 446

JASPER, D.E., F.J. MARTINEZ und J.D. DELLINGER (1984):

Evaluation of latex agglutination tests for establishing
coagulase status of staphylococci from milk.

Can. J. Comp. Med. 48, 223 - 224

JASPER, D.E., F. INFANTE und J.D. DELLINGER (1985):

Relationship among the results of coagulase, staphylococcal toxin, and thermonuclease tests on staphylococci from cow milk.

J. Clin. Microbiol. 21, 582 - 584

JELJASZEWICZ, J. (1958):

Some experiments in staphylocoagulase. I. Methods of determination of free and bound coagulase (in polnisch).

Acta Microbiol. Pol. 7, 17 - 34

JELJASZEWICZ, J., L.M. SWITALSKI und C. ADLAM (1983):

Staphylocoagulase and clumping factor.

in: EASMON, C.S.F. und C. ADLAM: Staphylococci and staphylococcal infections, Bd. II (The organism in vitro and in vivo), p. 525 - 557

Academic Press Inc., London

JENKINS, C.J. und W.I. METZGER (1959):

Evaluation of different substrates for the staphylococcal coagulase test and a comparison of the tube and the slide techniques.

J. Lab. Clin. Med. 54, 141 - 144

JONES, T.O. und P.J. HEATH (1985):

β - Lactamase production in Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis milk.

Vet. Rec. 117, 340

JONSSON, P. und O. HOLMBERG (1981):

Staphylococcus aureus isolated from acute and chronic mastitis. Comparative studies on bacterial surface characteristics, biochemical properties and phage typing.

in: JELJASZEWICZ, J. (Hrsg.): Staphylococci and staphylococcal infections, Zbl. Bakt. Suppl. 10

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York

JUNG, R. (1988):

Staphylokokken - Enterotoxin E - Nachweis mittels ELISA
sowie Reinigung mit Hilfe affinitätsgereinigter
Antikörper.

Diss. med. vet. München

KATO, E. und T. KUME (1980):

Enterotoxigenity of bovine staphylococci isolated from
California mastitis test-positive milk in Japan.

Jpn. J. Vet. Res. 28, 75 - 85

KILPPER - BÄLZ, R. und K.H. SCHLEIFER (1981):

Transfer of peptococcus saccharolyticus Foubert and
Douglas to the genus Staphylococcus:

Staphylococcus saccharolyticus (Foubert and Douglas)
comb. nov.

Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. C 2, 324 - 331

KITZROW, D. (1972):

Kapselbildung bei Staphylococcus aureus.

Diss. med. vet. Gießen

KITZROW, D. und H. BLOBEL (1981):

Einfluß der Staphylokinase und Proteasen von
Staphylococcus aureus auf den Koagulasenachweis.

Zbl. Vet. Med. B 28, 624 - 629

KLEMPERER, R. und G. HAUGHTON (1957):

A medium for the rapid recognition of penicillin-
resistent coagulase-positive staphylococci.

J. clin. Path. 10, 96 - 99

KLOOS, W.E. und K.H. SCHLEIFER (1975):

Isolation and characterization of staphylococci from human skin.

II: Descriptions of four new species *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis* and *Staphylococcus simulans*.

Int. J. Syst. Bacteriol. 25, 62 - 79

KLOOS, W.E. und K.H. SCHLEIFER (1983):

Staphylococcus auricularis sp nov.: an inhabitant of the human external ear.

Int. J. Syst. Bacteriol. 33, 9 - 14

KLOOS, W.E., K.H. SCHLEIFER und R.F. SMITH (1976):

Characterization of *Staphylococcus sciuri* sp. nov. and its subspecies.

Int. J. Syst. Bacteriol. 26, 22 - 37

KOENIG, M.G. (1962):

Factors relating to the virulence of staphylococci

I. Comparative studies on two colonial variants.

Yale J. Biol. Med. 34, 537 - 559

KOKAN, N.P. und M.S. BERGDOLL (1987):

Detection of low - enterotoxin - producing *S. aureus* strains.

Appl. Environ. Microbiol. 53, 2675 - 2676

KURZWEIL, R. und M. BUSSE (1973):

Keimgehalt und Florazusammensetzung der frisch ermolkene Milch.

Milchwissensch. 28, 427 - 431

LACEY, R.W. (1975):

Antibiotic resistance plasmids of *Staphylococcus aureus* and their clinical importance.

Bacteriol. Rev. 39, 1 -32

LACHICA, R.V.F., C. GENIGEORGIS und P.D. HOEPRICH (1971):
Metachromatic agar-diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity.

Appl. Microbiol. 21, 585 - 587

LACHICA, R.V.F., S.S. JANG und P.D. HOEPRICH (1979):

Thermonuclease seroinhibition test for distinguishing *Staphylococcus aureus* from other coagulase-positive staphylococci.

J. Clin. Microbiol. 9, 141 - 143

LANGLOIS, B.E., R.J. HARMON und K. AKERS (1984):

Biochemical identification of *Staphylococcus* species of bovine origin.

American Dairy Science Association 79th annual meeting, 24.-27. June,

Suppl. 1, J. Dairy Sci. 67, P 194

LAVELLE, P.W. und R.S. TOURIGNY (1968):

Staphylococcus coagulase direct plate method.

Am. J. Clin. Pathol. 49, 594 -595

LEE, C.S. und A.J. FROST (1970):

Mastitis in slaughtered dairy cows

1. Udder infection

Aust. vet. J. 46, 201 -203

LINSELL, W.D. und R.H. GORRILL (1951):

The effects of heat and sodium ethyl mercuri -thio -
salicylate on the staphylocoagulase test.

J. clin. Path. 4, 73 - 77

LITKENHOUS, C.J., E.F. BAER, M.M. GILDEN und M.B. BROMER
(1968):

False - positive coagulase reactions in the characteri-
zation of microorganisms isolated from foods.

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 51, 1 - 3

LOEB, L. (1903):

The influence of certain bacteria on the coagulation of
blood.

J. med. Res. 10, 407 - 419

LOKEN, K.I. und H.H. HOYT (1962):

Studies on bovine staphylococcal mastitis

I. Characterization of staphylococci.

Am. J. Vet. Res. 23, 534 - 540

LOMBAI, G., L. JANOSI, F. KATONA, P. MAJOR, H.MILCH, L.
ORMAY und J. TAKACS (1980):

Eigenschaften und lebensmittelhygienische Bedeutung von
aus Eutern isolierten Staphylococcus aureus-Stämmen.

Arch. Lebensmittelhyg. 31, 206 - 209

LUPKE, H. (1982):

Untersuchungen zur Staphylokokken - Mastitis

Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 95, 433 - 435

MAHMOUD, S.A.Z., M.M. SABBOUR, K. NAGUIB, A. HAZEM und O.M. SHARAF (1980):

Production of coagulase, haemolysins and thermonuclease by staphylococci and micrococci isolated from milk and dairy products.

Arch. Lebensmittelhyg. 31, 5 - 6

MARSHALL, J.H. und G.J. WILMOTH (1981a):

Pigments of staphylococcus aureus, a series of triterpenoid carotenoids.

J. Bacteriol. 147, 900 - 913

Dieselben (1981b):

Proposed pathway of titerpenoid carotenoids biosynthesis in Staphylococcus aureus: Evidence of a study of mutants.

J. Bacteriol. 147, 914 - 919

MAYER, S. (1975):

Enterotoxinbildungsvermögen boviner und humaner Staphylokokken unter Berücksichtigung der Antibiotikaresistenz und anderer biologischer Eigenschaften.

Diss. med. vet. München

MÖLLBY, R. (1983):

Isolation and properties of membrane damaging toxins.

in: EASMON, C.S.F. und C. ADLAM: Staphylococci and staphylococcal infections, Bd. II (The organism in vitro and in vivo), p. 619 - 669

Academic Press Inc., London

MORTON, H.E. und J. COHN (1972):

Coagulase and desoxyribonuclease activity of staphylococci isolated from clinical sources.

Appl. Microbiol. 23, 725 - 733

MUCH, H. (1908):

Über eine Vorstufe des Fibrinfermentes in Kulturen von *S.aureus*.

Biochem. Z. 14, 143 -155

MUSHIN, R. und V.J. KERR (1954):

Clotting of citrated plasma and citrate utilization by intestinal gram-negative bacilli.

J. Gen. Microbiol. 10, 445 - 451

MYRICK, B.A. und P.D. ELLNER (1982):

Evaluation of the latex slide agglutination test for identification of *Staphylococcus aureus*.

J. Clin. Microbiol. 15, 275 - 277

NAIDU, T.G. und F.H.S. NEWBOULD (1975):

Significance of beta-hemolytic *Staphylococcus aureus* as a pathogen to the bovine mammary gland.

Zbl. Vet. Med. B 22, 308 - 317

NISKANEN, A. und L. KOIRANEN (1977):

Correlation of enterotoxin and thermonuclease production with some physiological and biochemical properties of staphylococcal strains isolated from different sources.

J. Food Prot. 40, 543 - 548

NOBLE, W.C. (1966):

Virulence and the biochemical characters of staphylococci.

J. Path. Bact. 91, 181 -193

NOWAKOWSKI, W., W. JABLONSKA und P.B. HECZKO (1985):

Evaluation of rapid screening tests for *Staphylococcus aureus* strains isolated from cow milk.

in: JELJASZEWICZ, J. (Hrsg.): The staphylococci

Zbl. Bakt. Suppl. 14,

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York

OBIGER, G. (1964):

Zur Therapie der infektiösen Mastitis und Sanierung der Milchviehbestände von den chronischen Eutererkrankungen.
Tierärztl. Umschau 19, 117 - 124

O'CONNOR, J.J., A.T. WILLIS und J.A. SMITH (1966):

Pigmentation of *Staphylococcus aureus*.
J. Path. Bact. 92, 585 - 588

OEDING, P., J.-L. MARADON, V. HAJEK und E. MARSALEK (1971):

A comparison of phage pattern and antigenic structure with biochemical properties of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cattle.
Acta path. microbiol. scand. Section B. 79, 357 - 364

OLSON, J.C., E.P. CASMAN, E.F. BAER und J.E. STONE (1970):

Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* cultures isolated from acute cases of bovine mastitis.
Appl. Microbiol. 20, 605 - 607

OPDEBEECK, J.P., A.J. FROST, D. O'BOYLE und N.L. NORCROSS (1987):

The expression of capsule in serum-soft agar by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis.
Vet. Microbiol. 13, 225 - 234

ORTH, D.S., L.R. CHUGG und A.W. ANDERSON (1971):

Comparison of animal sera for suitability in coagulase testing.
Appl. Microbiol. 21, 420 - 425

OSOWIECKI, H., A. MLYNARCZYK und G. MLYNARCZYK (1981):
Drug resistance in *Staphylococcus aureus* - genetic and
biochemical basis.

in: JELJASZEWICZ, J. (Hrsg.): *Staphylococci and staphylo-
coccal infections*, Zbl. Bakt. Suppl. 10,
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York

O'TOOLE, D.K. (1987):

Differences in the egg yolk reaction on Baird-Parker
medium between bovine and human strains of coagulase-
positive staphylococci.

Letters in Appl. Microbiol. 4, 111 - 112

OTTEN, H., M. PLEMPPEL und W. SIEGENTHALER (1975):

Antibiotikafibel - Antibiotika und Chemotherapeutika -
Therapie mikrobieller Infektionen.

Georg Thieme Verlag Stuttgart, p. 202 - 203

OWENS, J.J. (1974):

The egg yolk reaction produced by several species of
bacteria.

J. appl. Bact. 37, 137 - 148

OWENS, J.J. und P.C.L. JOHN (1975):

The egg yolk and lipolytic reactions of coagulase
positive staphylococci.

J. appl. Bact. 39, 23 - 30

PARK, C.E., A. DE MELO SERRANO, M. LANDGRAF, J. C. HUANG,
Z. STANKIEWICZ und M. K. RAYMAN (1980):

A survey of microorganisms for thermonuclease production.
Can. J. Microbiol. 26, 532 - 535

PASSET, J. (1885):

Über Microorganismen der eitrigen Zellgewebsentzündungen des Menschen.

Fortschr. Med. 3, 33 - 43

zit. n. SPERBER, W.H. (1977):

The identification of staphylococci in clinical and food microbiological laboratories.

CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 7, 121 - 184

PHILLIPS, W.E. und W.E. KLOOS (1981):

Identification of coagulase - positive Staphylococcus intermedius and Staphylococcus hyicus subsp. hyicus isolates from veterinary clinical specimens.

J. Clin. Microbiol. 14, 671 - 673

POUTREL, B. und M. DUCELLIEZ (1979):

Evaluation of three rapid tests for identification of S. aureus isolated in bovine milk.

Ann. Rech. Vet. 10, 125 -129

RAMMELKAMP, Jr.C.H., M.M. HEZEBICKS und J.H. DINGIE (1950):

Spezific coagulase of Staphylococcus aureus.

J. Exp. Med. 91, 295 - 300

RAYMAN, M.K., C.E. PARK, J. PHILPOTT und E.C.D. TODD (1975):

Reassessment of the coagulase and thermostable nuclease tests as means of identifying S. aureus.

Appl. Microbiol. 29, 451 - 454

RAYMOND, E.A. und W.H. TRAUB (1970):

Identification of Staphylococci isolated from clinical material.

Appl. Microbiol. 19, 919 - 922

REID, W.B. und J.B. WILSON (1959):

A study of staphylococci associated with the bovine udder.

Am. J. Vet. Res. 20, 825 - 831

REISER, R.F., R.N.ROBBINS, A.L. NOLETO, G.P. KHOE und M.S. BERGDOLL (1984):

Identification, purification and some physiochemical properties of staphylococcal enterotoxin C₃.

Infect. Immun. 45, 625 - 630

RÖDER, R. (1985):

Beziehungen zwischen Zellgehalt und bakteriologischem Befund von Viertelgemelksproben beim Deutschen Fleckvieh.
Diss. med. vet. München

ROSENBAACH, F.J. (1884):

Microorganismen bei den Wund - Infektionskrankheiten des Menschen.

Bergmann, J.F., Wiesbaden

SABATH, L.D., N. WHEELER, M. LAVERDIERE, D. BLAZEVIC und B.J. WILKINSON (1977):

A new type of penicillin resistance of Staphylococcus aureus.

Lancet (1), 443 - 447

SABOLIC, M., W. WONKA und R. GERLACH (1980):

Zum Vorkommen penicillinasebildender Staphylokokken und Mikrokokken im Euter bei Milchviehherden.

Tierärztl. Umschau 35, 671 - 674

SANKARAN, R. und R.K. LEELA (1982):

Comparison of coagulase and thermonuclease activities with enterotoxin production by staphylococci from foods.

Nahrung 26, 549 - 553

SCHAEREN. W., T. JEMMI und M. SCHÄLIBAUM (1986):
Resistenzsituation der wichtigsten Mastitiserreger beim
Rind.

Schweiz. Arch. Tierheilk. 128, 401 - 406

SCHALM, O.W., E.J. CAROLL und N.C. JAIN (1971):

Bovine mastitis.

Lea & Febinger, Philadelphia

SCHAUPETER, A. (1987):

Charakterisierung von clumping-factor-negativen Staphylo-
kokken aus entzündlichen Prozessen von Haustieren.

Diss. med. vet. Berlin

SCHLEIFER, K.H. (1986):

Gram-positive Cocci

in: SNEATH, P.H.A., N.S. MAIR, M.E. SHARPE und J.G. HOLT:

BERGEY'S Manual of Systematic Bacteriology, Bd. II,

The Williams & Wilkins Company, Baltimore

SCHLEIFER, K.H. und W.E. KLOOS (1975):

Isolation and characterization of staphylococci from
human skin.

Int. J. Syst. Bacteriol. 25, 50 - 79

SCHLEIFER, K.H. und U. FISCHER (1982):

Description of a new species of the genus *Staphylococcus*:
Staphylococcus carnosus.

Int. J. Syst. Bacteriol. 32, 153 - 156

SCHLEIFER, K.H., R. KILPPER - BÄLZ, U. FISCHER, A. FALLER und J. ENDL (1982):

Identification of " *Micrococcus candidus* " ATCC 14852 as a strain of *Staphylococcus epidermidis* and of " *Micrococcus caseolyticus* " ATCC 13548 and *Micrococcus varians* ATCC 29750 as members of a new species, *Staphylococcus caseolyticus*.

Int. J. Syst. Bacteriol. 32, 15 - 20

SCHLEIFER, K.H., U. GEYER, R. KILPPER - BÄLZ und L.A. DEVRIESE (1983):

Elevation of *Staphylococcus sciuri* subsp. *lentus* (KLOOS et al.) to species status: *Staphylococcus lentus* (KLOOS et al.) comb. nov.

Syst. Appl. Microbiol. 4, 382 - 387

SCHLEIFER, K.H., R. KILPPER - BÄLZ und L.A. DEVRIESE (1984):

Staphylococcus arlettae sp. nov., *S. equorum* sp. nov. and *S. kloosii* sp. nov.: three new coagulase - negative, novobiocin - resistant species from animals.

Syst. Appl. Microbiol. 5, 501 - 509

SCHREINER, H. (1985):

Zum Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen am Modell des Typ C₁ mit dem Sandwich-ELISA.

Diss. med. vet. München

SINELL, H.-J. und J. BAUMGART (1967):

Selektivnährböden mit Eigelb zur Isolierung von pathogenen Staphylokokken aus Lebensmitteln.

Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 204, 248 - 264

SLANETZ, L.W. und C.H. BARTLEY (1953):

The diagnosis of staphylococcal mastitis, with special reference to the characteristics of mastitis staphylococci.

J. Infect. Dis. 92, 139 - 151

SMITH, R.E. und H.V. HAGSTAD (1985):

Infection of the bovine udder with coagulase - negative staphylococci.

Kieler Milchwirtschaftl. Forschungsberichte 37, 611 - 614

SMITH, W. und J. H. HALE (1944):

The nature and mode of action of staphylococcus coagulase.

Brit. J. exp. Path. 25, 101 - 110

SMITH, M.L. und S.A. PRICE (1938):

Staphylococcus ♂ haemolysin.

J. Path. Bact. 47, 370 - 393

SMITH, M.R., K. YOSHIDA und Y. NAITO (1971):

Use of the clumping factor reaction for the identification of encapsulated strains of Staphylococcus aureus from human sources.

Infect. Immun. 3, 707 - 708

SOMMERFELD, P. und G. TERPLAN (1975):

Methoden zum Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen.

Arch. Lebensmittelhyg. 26, 128 - 137

SOMPOLINSKY, D. (1953):

De l'impetigo contagiosa suis et du Micrococcus hyicus u. sp.

Schweiz. Arch. Tierheilk. 95, 302 - 309

SPERBER, W.H. (1977):

The identification of staphylococci in clinical and food microbiology laboratories.

CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 7, 121 - 184

SPERBER, W.H. und S.R. TATINI (1975):

Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*.

Appl. Microbiol. 18, 991 - 993

STADHOUDERS, J., F. HASSING und N.O. VAN AALST - VAN MAREN (1976):

A pour plate method for the detection and enumeration of coagulase - positive *Staphylococcus aureus* in the BAIRD - PARKER medium without egg yolk.

Neth. Milk Dairy J. 30, 222 - 229

SURGALLA, M.J., M.S. BERGDOLL und G.M. DACK (1954):

Staphylococcal enterotoxin: Neutralization by rabbit antiserum.

J. Immunol. 72, 398 - 403

TAGER, M. (1948):

Concentration, partial purification, properties and nature of staphylocoagulase.

Yale J. Biol. Med. 20, 369 - 380

TAKEUCHI, S., Y. KOBAYASHI und S. NIIBORI (1985):

Isolation and some properties of *S. hyicus* subsp. *hyicus* from pigs, chickens and cows.

Jpn. J. Vet. Sci. 47, 841 - 843

TATINI, S.R. (1975):

Anwendung einer hitzestabilen Nuclease zum Screening von Nahrungsmitteln auf die vermutliche Anwesenheit von Enterotoxinen.

Arch. Lebensmittelhyg. 26, 24

TATINI, S.R., B.R. CORDS und J. GRAMOLI (1976):

Screening for staphylococcal enterotoxins in food.

Food Technol. 30, 64 - 74

TERPLAN, G. und K.-J. ZAADHOF (1969):

Zur diagnostischen und lebensmittelhygienischen Bedeutung von *Staphylococcus aureus* in Kuhmilch.

Dtsch. Tierärztl. Wschr. 76, 217 - 221

TERPLAN, G., K.-J. ZAADHOF und S. BOBETH (1971):

Zum Vorkommen und Nachweis von enterotoxinbildenden Staphylokokken in Milch.

Alimenta Sonderausgabe 1971, 51 - 56

THOMAS, N. und V.K. NAMBU DRIBAD (1974):

Bildung einer extracellulären thermostabilen DNase und eines Enterotoxins durch Enterokokken.

XIX. Int. Milchwirtschaftskongreß Indien, Neu Dehli,
2. - 6. Dez., B. 8, 591 - 592

TIMMS, L.L. und L.H. SCHULTZ (1987):

Dynamics and significance of coagulase-negative staphylococcal intramammary infections.

J. Dairy Sci. 70, 2648 - 2657

UNTERMANN, F. und H.-J. SINELL (1970):

Beitrag zum Vorkommen enterotoxinbildender Staphylokokken
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 215, 166 - 172

UNTERMANN, F., D. KUSCH und H. LUPKE (1973):

Zur Bedeutung der Mastitis-Staphylokokken als Ursache von Lebensmittelvergiftungen.

Milchwissensch. 28, 686 - 688

USHIODA, H., T. TERAYAMA, S. SAKAI, H. ZEN-YOJI, M. NISHIWAKI und A. HIDANO (1981):

Coagulase typing of *Staphylococcus aureus* and its application in routine work.

in: JELJASZEWICZ, J. (Hrsg.): *Staphylococci and staphylococcal infections*, Zbl. Bakt. Suppl. 10, p. 77 - 83

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York

WALBUM, L.E. (1922):

Studium über die Bildung der bakteriellen Toxine.

I. Mitteilung Staphylolysin.

Biochem. Z. 129, 367 - 443

WATTS, J.K., W.E. OWENS und S.C. NICKERSON (1986a):

Evaluation of the minitek gram - positive set for identification of staphylococci isolated from the bovine mammary gland.

J. Clin. Microbiol. 23, 873 - 875

WATTS, J.L., J.W. PANKLEY, W.M. OLIVER, S.C. NICKERSON und A.W. LAZARUS (1986b):

Prevalence and effects of intramammary infections in beef cows.

J. Anim. Sci. 62, 16 - 20

WEGRZYNOWICZ, Z., P.B. HECZKO, J. JELJASZEWICZ, M. NEUGEBAUER und G. PULVERER (1979):

Pseudocoagulase activity of staphylococci.

J. Clin. Microbiol. 9, 15 - 19

WEGRZYNOWICZ, Z., P.B. HECZKO, G.P. DRAPEAU, J. JEL-JASZWICZ und G. PULVERER (1980):

Protrombin activation by a metalloprotease from *Staphylococcus aureus*.

J. Clin. Microbiol. 12, 138 - 139

WIENEKE, A.A. (1974):

Enterotoxin production by strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods and human beings.

J. Hyg. Camb. 73, 255 - 262

WILLIAMS R.E.O. und G.J. HARPER (1946):

Determination of coagulase and alpha - haemolysin production by staphylococci.

Brit. J. Exp. Path. 27, 72 - 81

Dieselben (1947):

Staphylococcal haemolysins on sheep-blood agar with evidence for a fourth haemolysin.

J. Path. Bact. 59, 69 - 78

WILSON, C.D. und M.S. RICHARDS (1980):

A survey of mastitis in the British dairy herds.

Vet. Rec. 106, 431 - 435

WISEMAN, G.M. (1965):

Some characteristics of the beta - haemolysin of *Staphylococcus aureus*.

J. Path. Bact. 89, 187 - 207

WISEMAN, G.M. (1975):

The haemolysins of *Staphylococcus aureus*.

Bact. Rev. 39, 317 - 344

ZAJDEL, M., Z. WEGRZYNOWICZ, J. JELJASZEWICZ und G. PULVERER (1973):

Mechanism of action of staphylocoagulase and clumping factor.

in: JELJASZEWICZ, J. (Hrsg.): Staphylococci and staphylococcal infections, Bd. I (Contributions to microbiology and immunology, Karger Verlag, Basel

ZAJDEL, M., Z. WEGRZYNOWICZ, J. SAWECHA, J. JELJASZEWICZ, G. PULVERER (1975):

Mechanism of action of staphylocoagulase.

in: JELJASZEWICZ, J. (Hrsg.): Staphylococci and staphylococcal infections, Zbl. Bakt. Suppl. 5, p. 549 - 575
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, London

ZEMELMAN, R. und L. LONGERI (1965):

Characteristics of staphylococci isolated from raw milk.
Appl. Microbiol. 13, 167 - 170

Herrn Prof. Dr. G. Terplan möchte ich abschließend für die Überlassung des Themas und für seine Unterstützung danken.

Ganz besonders danke ich Herrn Dr. H. Becker für seine verständnisvolle Betreuung, engagierte Beratung und Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Dr. E. Kleinschroth gilt mein Dank für die Möglichkeit, die Untersuchungen am TGD Kempten durchführen zu können und für seine freundliche Unterstützung.

Allen Mitarbeitern am TGD Kempten danke ich für die nette Aufnahme und Unterstützung.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Institutes, die mich mit Rat und Hilfe unterstützt haben.

Lebenslauf

Name: Katharina, Gabriele Gang-Stillner
Geburtsdatum: 5. Mai 1958
Geburtsort: München
Eltern: Emmi Gang, geb. Eberle
Manfred Gang
Schulausbildung: 1964-1968 Evangelische Volksschule an
der Sutt, Kempten
1968-1977 Simon-Marius-Gymnasium,
Gunzenhausen
Abitur: 24. Juni 1977
Studium: 1980-1986 Studium der Tiermedizin an
der Ludwig-Maximilians-
Universität München
Approbation: 17. September 1986 Approbation als
Tierärztin
Dissertation: seit Januar 1987 am Lehrstuhl für
Hygiene und Technologie der Milch
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

